DROLOXIFEN - EIN NEUES ANTIESTROGEN IN DER THERAPIE MENSCHLICHER TUMOREN AUF ATHYMISCHEN MÄUSEN

PETER STELZER

1988

Disbui. München
1988

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0064

Aus der KLINGE PHARMA GmbH München

PD Dr. Dr. H. J. Staab

vorgelegt über

Prof. Dr. A. Schmid

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

DROLOXIFEN - EIN NEUES ANTIESTROGEN IN DER THERAPIE MENSCHLICHER TUMOREN AUF ATHYMISCHEN MÄUSEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der

Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität

München

von

Peter Stelzer

aus

München

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. A. Schmid

Korreferent: Prof. Dr. M.-A. Hasslinger

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Gewidmet meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

		Seit
I.	E I N L E I T U N G	1
II.	L I T E R A T U R Ü B E R S I C H T	
1.	H O R M O N R E Z E P T O R P R O T E I N E	
1.1.1	Wirkungsweise der Estrogene	2
1.1.2	Estrogen- und Progesteronrezeptorproteine	3
1.2	Qualitative und quantitative Nachweisverfahren von Rezeptorproteinen	
1.2.1	Quantitatives Nachweisverfahren von Estrogenrezeptor-proteinen mit monoklonalen Estrogenrezeptorprotein-Antikörpern	6
1.2.2	Qualitatives Immunozytochemisches Nachweisverfahren von Estrogenrezeptorproteinen	6
1.2.3	Nachweisverfahren mit radioaktiv markierten Steroiden	7
2.	A N T I H O R M O N E L L E T H E R A P I E	
2.1	Antiestrogene und ihre Wirkmechanismen	8
2.2	Klinische Resultate bei der Therapie von Karzinomen	9
3.	D R O L O X I F E N	
3.1	Chemie	11
3.2	ER - Affinität	11
3.3	Agonistische und antagonistische Eigenschaften	12
3.4	Metabolisierung und Toxizität	12

III. E I G E N E U N T E R S U C H U N G

1. P R O B L E M S T E L L U N G 1

2. DAS IN VIVO TESTMODELL DER NACKTMAUS

2.1 Versuchstiere 1

2.2 Standardisierung der Experimente 1

2.2.1 Tierhaltung 1

2.2.2 Tierfütterung

3. C H A R A K T E R I S I E R U N G D E R T U M O R E N

3.1 Herkunft des Transplantationsmaterials 1

3.2 Klassifikation der Tumoren 1

3.2.1 Histologische Klassifikation 1

3.2.2 Rezeptorstatus 2

3.2.3 Biochemische Klassifikation 2

4. V E R S U C H S D U R C H F Ü H R U N G

4.1 Transplantationstechnik 2

4.2 Bestimmung des Tumorvolumens 2

4.3 Therapieschema 2

4.4 Dosierung 2

4.5 Applikationsform 2

5. V E R S U C H S A U S W E R T U N G

5.1 Quantitative Bestimmung der Estrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren

5.1.1 Aufbewahrung, Vorbereitung und Proteinbestimmung 26

5.1.2 Bestimmung der Estrogenrezeptoren mit einer enzymimmunologischen Methode 27

5.1.3 Bestimmung der Estrogen- und Progesteronrezeptoren mit radioaktiv markierten Steroidhormonen 27

5.2 Qualitative Färbung der Estrogenrezeptoren 30

5.2.1 Immunozytochemische Färbung der Estrogenrezeptoren 30

5.2.1.1 Paraffineinbettungstechnik 30

5.2.1.2 Gefrierschnittechnik 31

5.3 Statistik 32

6. E R G E B N I S S E

6.1 Wachstumskurven und Tabellen 33

6.1.1 Tumor 1 33

6.1.1.1 Tabelle und Statistik 33

6.1.1.2 Wachstumskurve 34

6.1.2 Tumor 2 35

6.1.2.1 Tabelle und Statistik 35

6.1.2.2 Wachstumskurve 36

6.1.3 Tumor 3 37

6.1.3.1 Tabelle und Statistik 37

6.1.3.2 Wachstumskurve 38

6.2 Rezeptoren 39

6.3 Isoenzyme 41

6.3.1 Phänotypische Charakterisierung der untersuchten Tumoren 41

6.3.2 Änderung des Phänotyps der humanen Tumoren unter Droloxifen-Therapie 42

6.4 Immunozytochemische Färbung der Estrogenrezeptoren 45

IV. D I S K U S S I O N 46

V. Z U S A M M E N F A S S U N G 51

VI. S U M M A R Y 52

VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 53

VIII. A N H A N G

1. ORIGINALMESSDATEN ZUM TUMOREXPERIMENT 1 (Tumor 1) 65

2. ORIGINALMESSDATEN ZUM TUMOREXPERIMENT 2 (Tumor 2) 66

3. ORIGINALMESSDATEN ZUM TUMOREXPERIMENT 3 (Tumor 3) 68

IX. D A N K S A G U N G 70

LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

DCC	Dextran Coated Charcoal
E	Estrogen
EIA	Enzyme Immuno Assay
ER	Estrogenrezeptorprotein
fmol	Femtomol (10^{-15} Mol)
i.p.	intra peritoneal
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
m	molar
M	Mol
mg	Milligramm
mM	Millimol
N	normal
ND-Droloxifen	N-Desmethyl-Droloxifen
nm	nanometer
nM	nano Mol

nu/nu	homozygot reinerbiger Stamm der Nacktmaus ("nude / nude")
PAP	Peroxidase Anti-Peroxidase
PBS	Phosphate Buffered Saline (= Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PR	Progesteronrezeptorprotein
TAM	Tamoxifen

I. EINLEITUNG

Die Zusammenhänge zwischen Estrogenen und dem Wachstum von Mammakarzinomen waren lange nicht bekannt. Erst gegen Ende des letzten Jahrhunderts konnte Beatson, der auf diesem Gebiet Pionierarbeit leistete, die hormonelle Abhängigkeit des Wachstums von Brustkrebs zeigen (Beatson 1896). Er beobachtete eine Regression des fortgeschrittenen, metastasierenden Mammakarzinoms bei ovariektomierten Patientinnen. Die Entdeckung von Estrogenrezeptorproteinen in estrogenabhängigen Zielgeweben (mamma, uterus, vagina) konnte diese Befunde wissenschaftlich erklären (Jensen et al. 1962, Korenmann et al. 1970).

Die Prüfung der pharmakologischen Einflußnahme auf Hormonrezeptoren mit Antihormonen begann vor etwa 15 Jahren, als erste klinische Erfahrungen mit der Substanz Tamoxifen gesammelt wurden (Cole et al. 1971, 1972). Es handelt sich hierbei um ein nichtsteroidales Antiestrogen.

Heute sind Antiestrogene in der modernen Therapie des Mammakarzinoms ein fester Bestandteil der palliativen und adjuvanten Therapieformen. Der Vorteil der antihormonellen Therapie mit Antiestrogenen gegenüber der zytostatischen, der ablativ-chirurgischen und der Bestrahlungstherapie, liegt vor allem in der guten Verträglichkeit der endokrin aktiven Substanzen.
Die Präsenz intrazellulärer, spezifischer Rezeptoren für Steroidhormone in Tumorzellen gilt als Indikator für das Ansprechen auf eine antihormonelle Therapie (McGuire et al. 1978). Diese These konnte anhand der Remissionsraten von rezeptorunselektioniertem Krankengut (25-54 %) (Rose et al. 1980), im Vergleich zum rezeptorselektionierten (60-70 %) (Kolb et al. 1980) bewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit sind verschiedene Fragestellungen an dem in vivo Testmodell, der thymusaplastischen (nu/nu) Nacktmaus, die als Transplantatempfänger von humanem Tumorgewebe dient, bearbeitet worden:

1.) Wie wirkt Droloxifen, ein neues Antiestrogen, auf das Tumorwachstum, gemessen am Volumen eines xenotransplantierten
   a) ER - PR -
   b) ER - PR +
   c) ER + PR + - Tumors?

2.) Wie ist das Verhalten der Rezeptoren
   a) vor der Therapie
   b) 1 Woche -
   c) 2 Wochen -
   d) 3 Wochen -
   e) 4 Wochen nach Beginn der Therapie?

II. LITERATURÜBERSICHT

1. HORMONREZEPTORPROTEINE

1.1.1 Wirkungsweise der Estrogene

Die Förderung des Wachstums ist einer der Haupteffekte der Estrogene in ihren Zielzellen (mamma, uterus und vagina). Diese Proliferationsförderung wird, nach Bindung an Rezeptorproteine über eine Vielzahl molekularer Mechanismen erreicht, wobei die Induktion verschiedener Proteine im Vordergrund steht.

Ross et al. (1981) zeigten, daß Estrogene mitogene Substanzen für physiologisches und malignes Gewebe darstellen. Diese Befunde werden gestützt durch Untersuchungen die andere Autoren anstellten und direkt ein proliferatives Ansprechen einer humanen estrogenabhängigen Brustkrebszellinie auf physiologische Dosen von Estradiol beobachteten (Lippmann et al. 1976a, 1976b, Aitken et al. 1980).

Verschiedene Enzyme, die in der Nukleinsäuresynthese eine Rolle spielen, werden durch Estrogene maßgeblich beeinflußt (Lippmann et al. 1981, Cowan et al. 1982). Die Regulation folgender spezifischer Enzyme erfolgt durch Estradiol: Thymidin Kinase, Thymidilat Synthetase, Aspartat Transcarbamylase, Carbamyl Phosphat Synthetase, Dihydroorotase, Uridin Kinase und Dihydrofolat Reduktase (Kasid und Lippmann 1986).

Huseby et al. (1984) beobachtete, daß Estrogene nicht unbedingt im Kreislaufsystem eines tumortragenden Tieres zirkulieren müssen, um eine Proliferation auszulösen. Die Präsenz von Estrogenen in der Nähe des Tumors ist seinen Untersuchungen zufolge ausreichend. Daraus folgerte er eine Induktion von spezifischen Wachstumsfaktoren, ausgelöst durch Estrogene.

Lippmann et al. (1987) isolierten bei in vivo- und in vitro-Versuchen mit humanen estrogenabhängigen Brustkrebszellinien folgende Wachstumsfaktoren in einer Quantität, die deutlich erhöht war: IGF 1 (Insulin-like Growth Factor 1), EGF (Epidermal Growth Factor) und TGF (Transforming Growth Factor). Darüberhinaus beobachteten sie eine Proliferation der estrogenabhängigen Gewebe in ihren Experimenten, und fanden eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein von Estrogen, erhöhten Wachstumsfaktorwerten und der Proliferationsfähigkeit des Gewebes.

Die drei natürlich vorkommenden Estrogene, Estradiol, Estron und Estriol, zeigen alle den gleichen Wirkungsmechanismus in ihren Zielzellen. Die Wirkungsintensität ist jedoch bei Estron und Estriol schwächer.

1.1.2 Estrogen- und Progesteronrezeptorproteine

Man weiß heute, daß Estrogenrezeptorproteine eine wesentliche Rolle bei der Interaktion der Estrogene mit der Zielzelle spielen.

Zum Beispiel zeigte Jungblut et al. (1976), daß das Rezeptorprotein auch ohne Steroidhormon biologische Wirkungen auszulösen vermag. Einige Autoren vermuten sogar in den Rezeptoren das eigentliche Wirkungsprinzip, wobei den Steroidhormonen lediglich eine optimierende Wirkung zugesprochen wird (Janne et al. 1975, Chan u. O`Malley 1976).

Die wichtigste Eigenschaft des ER ist die Fähigkeit, Estradiol im Zellkern zu konzentrieren und zurückzuhalten (Jensen et al. 1962).

Ein weiteres Steroidhormonrezeptorprotein ist der Progesteronrezeptor, der in enger Relation zum ER steht und in estrogenabhängigen Geweben (mamma, uterus, tuba uterina) lokalisiert ist. Progesteronrezeptorproteine wurden nachgewiesen in den Nuklei der Eileiterzellen von Hühnern (Gasc et al. 1984) sowie den Uteri von Hasenzellen (Perrot-Applanat et al. 1985). Der PR-Gehalt eines Tumorgewebes ist heute klinisch von Bedeutung, weil durch seine Bestimmung zusammen mit dem ER-Gehalt, eine verbesserte Vorhersage bezüglich des Ansprechens einer hormonellen bzw. antihormonellen Therapieform gemacht werden konnte (Horwitz et al. 1975, Horwitz u. McGuire 1977).

Die biochemischen Zusammenhänge zwischen dem ER und dem Progesteronrezeptorprotein sind jedoch noch weitgehend unklar.
Interessanterweise gibt es die Möglichkeit der Induktion von Progesteronrezeptoren durch Estradiolgaben wie Horwitz und McGuire (1980) erstmals an MCF-7-Mammatumorzellen zeigten.

Michel (1982) stellte eine signifikante Abnahme des Estrogenrezeptorgehaltes bei Applikation von Medroxyprogesteronacetat (MPA) fest. Dieser Effekt des MPA wurde auch von Di Marco (1980) und Mester et al. (1974) beschrieben.

Die biochemischen Interaktionen der Estrogene mit ihren Zielorganen werden in der Literatur folgendermaßen beschrieben:

Nachdem das Estrogen die Zielmembran des Zielorganes permeiert hat, verbindet es sich im Zytoplasma mit dem Estrogenrezeptorprotein zum Estrogen-Estrogenrezeptorkomplex. Diese Bindung ist notwendige Voraussetzung zur Konversion des Komplexes in eine aktivierte Form, welche in den Nukleus eindringen kann (De Sombre et al. 1975).

Der Estrogen-Estrogenrezeptorkomplex bindet sich nun an das Chromatin im Zellkern. Daraufhin nimmt die Fähigkeit des Chromatin zu, Actinomycin D zu binden (Leclercq et al. 1973) und RNA zu synthetisieren. Bei gleichgleichzeitigem Vorhandensein von Progesteron-Progesteronrezeptorkomplexen im Nukleus kommt es zur Konkurrenz um die Rezeptorproteinbindungsstellen am Chromatin. Eine derartige Konkurrenz um die Chromatinbindungsstellen vermindert die de-novo-Synthese zytoplasmatischer Estrogenrezeptoren und der durch den Estrogen-Estrogenrezeptorkomplex initiierten Proteinsynthese. Das Resultat dieser Interaktionen ist ein Verhindern des Auffüllens des zytoplasmatischen ER-Reservoirs (Nicholson 1976).

Eine neuere Theorie nach Greene and Press (1982) bezüglich der Wechselwirkungen zwischen Estrogenen und ihren Zielgeweben, soll anhand der Abb. 1 erläutert werden.
Das Estrogen wird in die Zelle aufgenommen; daraufhin wird es, entweder ungebunden oder an Proteine mit niedriger Affinität gebunden, in den Nukleus transferiert.
Die nachfolgende Interaktion mit unbesetzten Rezeptorproteinen resultiert in der Bildung des aktivierten, dimeren Steroidhormon-Rezeptorproteinkomplexes (Welshons et al. 1984).
Zwei Formen des Steroidhormon-Rezeptorproteinmoleküls sind nun eng an das Chromatin gebunden. Eine der Formen ist mit einem Salz (0,4 M KCl) extrahierbar. Die extraktionsresistente Form ist wahrscheinlich mit transkriptionell aktiver DNA korreliert (Alexander et al. 1986).

Die aus der induzierten Proteinsynthese entstandenen Proteine werden in einer posttranslationellen Modifikation zu spezifischen Proteinen transformiert.
Diese verlassen die Zelle, bleiben im Zytoplasma und dienen der Zellproliferation (Enzyme, Transportproteine mit niedriger Affinität) oder werden als Rezeptorproteine in den Kern zurückgeführt.

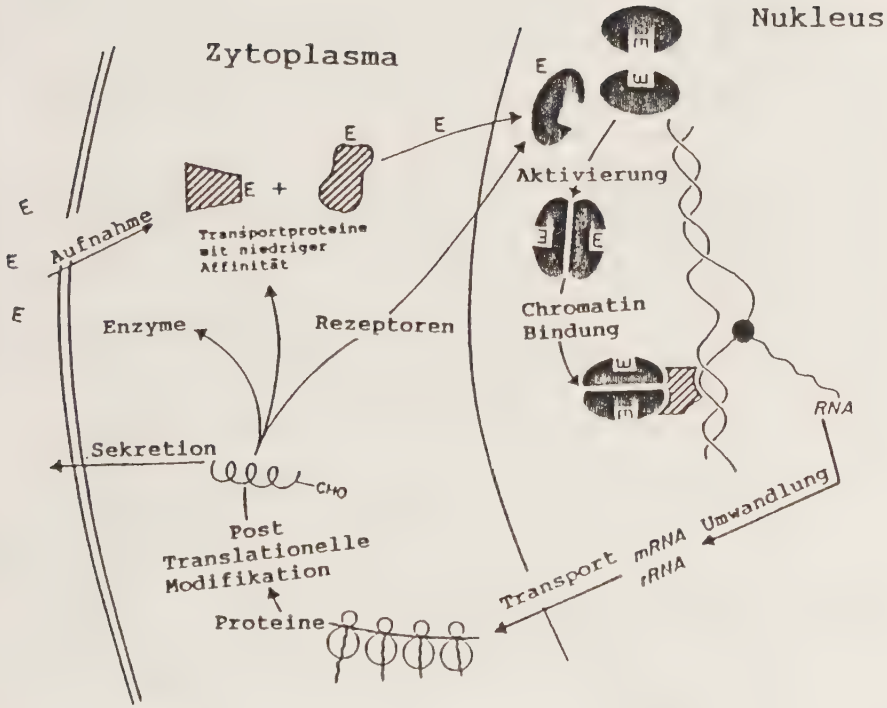


Abb. 1: Schematisches Diagramm der Estrogenwirkung in einer Zielzelle. Modifiziert nach Greene and Press (1982). (E: Estradiol)

1.2. Qualitative und quantitative Nachweisverfahren von Rezeptorproteinen

1.2.1 Quantitatives Nachweisverfahren von Estrogenrezeptorproteinen mit monoklonalen Estrogenrezeptorprotein-Antikörpern

Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Erstellung einer Eichkurve, aus welcher die unbekannten ER-Konzentrationen abgelesen werden können.

Dabei werden Antiestrogenrezeptor-Antikörper beschichtete Kugeln mit den Standards, Kontrollen und Gewebszytosolen inkubiert.

Etwaig vorhandene Estrogenrezeptoren werden an die Kugeln gebunden. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit einem weiteren Anti-ER-Antikörper welcher mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist.
Vorhandene Estrogenrezeptoren auf den Kugeln verbinden sich mit dem ER-Konjugat.

Es schließt sich eine Inkubation mit einer Enzym-Substratlösung an, deren Resultat eine Färbung ist, welche ein Maß für die Quantität des gebundenen ER-Konjugates darstellt.

Die Extinktion wird im Spektralphotometer gemessen.

Innerhalb des Arbeitsbereiches des Tests ist die Intensität der entstandenen Färbung zur ER-Konzentration der Probe proportional. Das Ablesen der ER-Konzentrationen der Proben erfolgt durch Ablesen aus der Standardeichkurve.

1.2.2 Qualitatives Immunozytochemisches Nachweisverfahren von Estrogenrezeptorproteinen

Hierbei kommt ein immunologisches Verfahren zur Sichtbarmachung der Estrogenrezeptoren in Gewebeschnitten zur Anwendung.

Zwei vorbehandelte Paraffinschnitte (siehe III., 5.2.1.1) bzw. Gefrierschnitte (siehe III., 5.2.1.2) werden auf Objektträgern aufgezogen.

Nach der Fixierung erfolgt eine Behandlung mit dem blockierenden Reagenz zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der nachfolgenden Reagenzien.

Ein Gewebeschnitt wird, zur Überprüfung unspezifischer Bindungen, mit dem primären Antikörper gegen Estrogenrezeptoren inkubiert, der andere mit dem Kontrollantikörper. Der Estrogenrezeptor wird dann mit Hilfe einer immunologisch-enzymatischen Reaktion sichtbar gemacht. Die Begutachtung der Schnitte kann durch mitgelieferte Kontrollschnitte vergleichend durchgeführt werden.

1.2.3 Nachweisverfahren mit radioaktiv markierten Steroiden

Dieser Test basiert auf dem Prinzip der Sättigung der Hormonbindungsstellen mittels ansteigender Konzentrationen radioaktiv markierten Hormons (^{3}H-Estradiol, bzw. ^{3}H-R 5020, ein synthetisches Gestagen) und anschließender Trennung des gebundenen vom ungebundenen Steroidhormon.

Die Trennung des gebundenen vom nichtgebundenen Hormon geschieht unter Zuhilfenahme von dextranbeschichteter Kohle (DCC = Dextran coated charcoal), die freies Hormon adsorbiert, hingegen an Protein gebundene Hormone nicht (Korenman u. Dukes, 1970).

Zur Differenzierung zwischen der spezifischen Bindung (an das Rezeptorprotein) und der unspezifischen Bindung (an andere Proteine, z.B.: Transcortin, Albumin) wird in einem Parallelansatz mit einem Überschuß von unmarkiertem Hormon gearbeitet.

Markiertes Hormon wird durch den Überschuß aus der sättigbaren, spezifischen Bindung verdrängt, jedoch nicht aus der nichtsättigbaren, unspezifischen Bindung.

Mit Hilfe der Scatchard-Analyse läßt sich dann der Rezeptorgehalt (Scatchard 1949) errechnen.

2. ANTIHORMONELLE THERAPIE

2.1 Antiestrogene und ihre Wirkmechanismen

Antiestrogene sind Substanzen, die in der Lage sind, estrogene Wirkungen zu antagonisieren. Seit den Arbeiten von Roberts und Szego (1953) waren diese Substanzen Gegenstand der pharmakologischen Forschung.
Wissenschaftliche Untersuchungen zeigten, daß die molekularen Mechanismen, die Estrogene auslösen, beeinflußbar waren. Somit schien es möglich mit geeigneten Substanzen Fruchtbarkeitsprobleme sowie bestimmte, auf endokrinen Dysfunktionen basierende hormonabhänige Tumoren, therapieren zu können.

Das Hauptaugenmerk lag auf der Gruppe der synthetischen nichtsteroidalen Antiestrogene. Diese Substanzen, gegen Ende der 50er, Anfang der 60er Jahre entwickelt, wurden zunächst auf ihre Fruchtbarkeitsbeeinflussung geprüft (Lerner et al. 1958, Emmens und Martin 1965, Terenius 1970, 1971).

Nach der Entdeckung der Estrogenrezeptorproteine in den meisten Mammakarzinomen (Jensen et al. 1967, Feherty et al. 1971) und der erfolgreichen Einführung von Tamoxifen (einem synthetischen nichtsteroidalen Antiestrogen), zur Therapie des fortgeschrittenen Mammakarzinoms (Mouridsen et al. 1978, Patterson 1981), expandierte die Forschung auf dem Gebiet der Estrogenantagonisten (Antiestrogene) und deren molekularbiologischen Wirkungen.

Eine der Theorien über den Wirkmechanismus von Antiestrogenen soll im folgenden beschrieben werden:
Nach Sutherland et al. (1981) permeieren Antiestrogene und ihre Metaboliten die Zellmembran und verbinden sich mit den frei im Zytoplasma vorliegenden Estrogenrezeptorproteinen. Nach Translokation des Antiestrogen-ER-Komplexes in den Nukleus reagiert dieser mit spezifischen Bindungsstellen am Chromatin.
Beobachtungen in einigen Säugetiersystemen (z.B. Ratten-Uterus, MCF-7-Zellen) korrelierten die Aktivität des nukleären Estrogen-Komplexes mit dem Chromatin eng mit einer gesteigerten Aktivität der RNA-Polymerase, gesteigerter RNA- und Proteinsynthese sowie einer erhöhten Synthese von Progesteronrezeptorproteinen. Alle diese Reaktionen werden von Antiestrogenen antagonisiert.
Antiestrogene zeigen jedoch auch estrogene Eigenschaften; z.B. die Zunahme des Uterusgewichtes bei der Ratte, der DNA, der RNA und des Gesamtproteins (Katzenellenbogen et al. 1975).
Antiestrogene können aber auch eine Bindung mit der von Sutherland 1979 entdeckten "Antiestrogenic Binding Site" eingehen, welche Estradiol nicht zu binden vermag. Der weitere Weg des Antiestrogen-"Antiestrogenic Binding Site"-Komplexes ist noch unbekannt.

Nach der neueren Theorie von Greene und Press (1982) ist der Estrogenrezeptor im Nukleus lokalisiert und Antiestrogene üben dort direkt ihre Wirkung aus. Die Theorie ist ausführlich unter Punkt II, 1.1 und mit der Abb. 1 beschrieben.
Die Rolle des natürlichen Agonisten Estrogen wird nun durch das Antiestrogen übernommen.

Etwa 1/3 aller estrogenabhängigen Brustkrebserkrankungen können durch Antiestrogene beeinflußt werden (Lippmann 1985). Um den Mechanismus der Einflußnahme von Antiestrogenen und ihren Metaboliten zu erforschen, untersuchte man ihre Affinität zum ER. Es zeigte sich eine hohe Affinität zum ER; dies ließ den Schluß des simplen Antagonismus der wachstumspromovierenden Effekte von Estrogenen an Tumoren und Normalgeweben zu (Jordan 1984). Ergänzend zu diesen Befunden konnten auch mikrosomale Bindungsstellen für Antiestrogene nachgewiesen werden (Watts et al. 1984).

Zum Beispiel wird die Pyrimidinbiosynthese durch Estrogene gefördert, hingegen durch Antiestrogene deutlich gebremst (Kasid und Lippmann 1986). Andere Autoren beobachteten bei Antiestrogentherapie eine in vitro-Zellzyklusblockade von estrogenabhängigen Brustkrebszellinien und eine in vivo-Reduktion bzw. einen Stillstand des Wachstums eines Tumors (Sutherland et al. 1983, Osborne et al. 1983, 1985).

Die hervorstechenden Fähigkeiten der nichtsteroidalen Antiestrogene, die zur Verlangsamung der Zellproliferation durch Inhibition metabolischer Schlüsselreaktionen führen (Lippmann et al. 1976, Edwards et al. 1980, Colzy et al. 1982) machen Antiestrogene für die Tumortherapie besonders attraktiv.

2.2 Klinische Resultate bei der Therapie von Karzinomen

Bisher wurden nur wenige Antiestrogene untersucht. Die am häufigsten angewandte Substanz ist das Tamoxifen (1-4-(2-Dimethylaminoethoxy)-Phenyl trans-1,2-diphenyl-1-buten).

TAM ist heute das Mittel der Wahl in der Behandlung rezeptorpositiver Mammakarzinome bei postmenopausalen Patientinnen.
Mouridsen et al. (1978) zeigten nach Auswertung weltweit gesammelter klinischer Daten die Sicherheit und Effizienz von TAM bei der palliativen Monotherapie des fortgeschrittenen postmenopausalen Mammakarzinoms.
Unter der Therapie mit TAM konnte bei prämenopausalen Patientinnen eine ähnliche Ansprechrate (33 %) wie bei postmenopausalen Patientinnen festgestellt werden (Meakin 1978).
Bei prämenopausalen Patientinnen mit Ovariektomie kann nämlich nicht das gesamte im Körper zirkulierende Estrogen beseitigt werden. Geringe Mengen Estrogen werden durch die Nebennieren synthetisiert und gelangen in den Kreislauf. Aufgrund der Blockade der estrogenen Effekte, auf

dem Niveau der Tumorzelle kann mit Antiestrogenen daher ein wirksamerer Effekt erwartet werden, als durch die alleinige Ovariektomie.

TAM vermindert auch nicht die klinische Wirksamkeit von vorausgegangenen und nachfolgenden Behandlungen (Stewart 1979). Darüber hinaus wurde in Einzelfällen auch ein Ansprechen der Therapie festgestellt, wo selbst androgene, estrogene und zytotoxische Substanzen keine Remission der Tumoren erzielten (Cole et al. 1971, Cole et al. 1972).

Aufgrund der wesentlich geringfügigeren Nebenwirkungen gegenüber anderen hormonellen oder zytostatischen Therapien, auch bei der adjuvanten Therapie des rezeptorpositiven Mammakarzinoms, ist auch hier TAM das Mittel der Wahl. Zwar wird das Medikament außergewöhnlich gut von den Patientinnen toleriert (Henningsen et al. 1977, Priestman et al. 1977), dennoch treten intrinsische Nebenwirkungen auf (Fex et al. 1981).

Aufgrund dieser Tatsache sucht die pharmakologische Forschung nach weiteren antiestrogen wirksamen Substanzen mit geringer ausgeprägten intrinsischen estrogenen Nebenwirkungen. Ein neues Antiestrogen "Droloxifen", das sich von Tamoxifen durch eine Hydroxylgruppe in 3'-Position unterscheidet zeigte bei vergleichbarer antiestrogener Wirkung in präklinischen Untersuchungen eine geringere intrinsische Estrogenität und ist Gegenstand der Untersuchung der vorliegenden Arbeit.

3. D R O L O X I F E N

3.1 Chemie

Die Verbindung Droloxifen hat folgende Strukturformel:

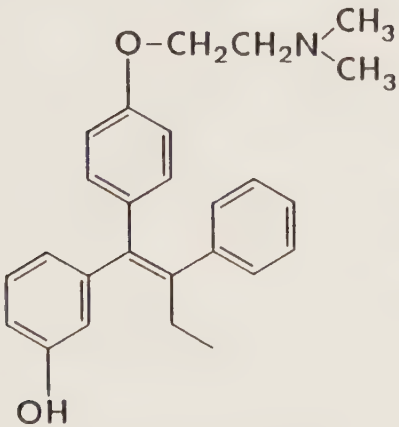


Abb. 2: Strukturformel von Droloxifen

Hierbei handelt es sich um:
(E)-1-[4'-(2-Dimethylaminoethoxy)phenyl]-1-(3'-hydroxyphenyl)-2-phenyl-but-1-en.
Droloxifen entspricht 3-OH-Tamoxifen.
In der vorliegenden Arbeit wurde Droloxifen-Zitrat, ein Salz von Droloxifen, verwendet.
Droloxifen ist nicht hygroskopisch, jedoch lichtempfindlich. Bei physiologischen pH-Bedingungen ist Droloxifen-Zitrat in wässriger Lösung praktisch unlöslich (KLINGE PHARMA München, interne Dokumentation).

3.2 ER - Affinität

Die Affinität von Droloxifen zum ER im Vergleich zur Vorläufersubstanz TAM wurde im Zytosol von uterinem Gewebe weiblicher weißer Neuseelandhasen getestet.

Das Prinzip beruht auf der Überprüfung des kompetitiven Einbaus von ^{3}H-Estradiol. Es konnte eine um den Faktor 10 höhere Bindung an den zytoplasmatischen ER als bei TAM festgestellt werden (Löser et al. 1986).

3.3 Agonistische und antagonistische Eigenschaften

Um die estrogenen und antiestrogenen Effekte aufzuzeigen, wurde juvenilen weiblichen Ratten TAM und Droloxifen in verschiedenen Dosen (1,6,12 mg/kg KG) per os appliziert. Das gleiche Experiment wurde wiederholt in Gegenwart von 1 mg/kg KG Estradiol.

Die Uteri der Tiere wurden in getrocknetem Zustand gewogen, um die uterotropen (estrogenen) bzw. antiuterotropen (antiestrogenen) Effekte zu beurteilen.

Mit Droloxifen behandelte uteri zeigten im Vergleich zu TAM eine wesentlich geringere Gewichtszunahme (uterotroper Effekt).
Die antiuterotropen Effekte stellten sich in dem Versuch bei TAM dosisunabhängig, bei Droloxifen klar dosisabhängig dar.
Die antiestrogene Wirkung ist bei Droloxifen somit stärker, die estrogene Potenz geringer ausgeprägt als bei TAM (Löser et al. 1986).

3.4 Metabolisierung und Toxizität

In Ratten und Marmosets wurde die Substanz N-Desmethyl-Droloxifen (= N-Desmethyl-3-OH-Tamoxifen) als Hauptmetabolit gefunden (Huber et al. 1985).

Droloxifen und sein Metabolit ND-Droloxifen zeigten bei Versuchen mit humanen Brustkrebszellen und Rattenuterusgewebe bezüglich ihrer estrogenen und antiestrogenen Eigenschaften nahezu gleiche pharmakologische Wirkung (Löser et al. 1986).

Auch in allen toxikologischen Untersuchungen schnitt Droloxifen wesentlich besser ab als TAM (siehe Tabelle 1 und 2).

Tab. 1: Zur akuten Toxizität von Droloxifen und TAM

LD50 Maus		Droloxifen	TAM
mg/kg KG	i.p.	1500	745
	per os	3000	2150
LD50 Ratte		**Droloxifen**	**TAM**
	i.p.	2250	700
	per os	4500	4100

(nach Löser et al. 1986)

Zur Feststellung der subchronischen Toxizität wurde ein 4wöchiger Versuch mit Ratten durchgeführt.
Es wurden Kollektive zu je 25 weiblichen und 25 männlichen Tieren gebildet.
Die oral applizierten Dosen betrugen 1, 10, 100 mg/kg KG.
Alle Dosen von Droloxifen wurden ohne Todesfälle oder toxische Symptome toleriert.

Dagegen zeigte TAM bei der 100 mg/kg KG-Dosis letal-toxische Effekte (siehe Tabelle 2).

Tab. 2: Zur subchronischen Toxizität von Droloxifen und TAM

		Dosierung mg/kg KG	Droloxifen	TAM	Kontrolle
weibliche Tiere	Gewichts-abweichg. in %	1	+16	+ 1	
		10	+ 4	-1	+33
		100	- 2	-19	
	Mortalität in %	1	0	0	
		10	0	0	0
		100	0	88	
männliche Tiere	Gewichts-abweichung in %	1	+ 7	+ 2	
		10	+ 3	+ 1	+16
		100	0	-17	
	Mortalität in %	1	0	0	
		10	0	0	0
		100	0	100	

(nach Löser et al. 1986)

Im Gastrointestinaltrakt, der Nebenniere und dem hämatopoetischen System zeigten sich ausschließlich bei TAM toxische Gewebsveränderungen (Löser et al. 1986).

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. PROBLEMSTELLUNG

Die Wirksamkeit des neuen Antiestrogens Droloxifen (siehe 3.) sollte bei humanen hormonabhängigen und -unabhängigen gynäkologischen Tumoren erprobt werden. Bisher wurde das Therapeutikum in vitro lediglich mit ER-positiven humanen Zellinien und in vivo gegenüber Tamoxifen (TAM) mit dem ER-positiven tierischen Tumor R 3230 AC verglichen.

Gegenüber TAM erzielte man mit Droloxifen in diesen Untersuchungen bei wesentlich geringeren Dosen stets die bessere Wirkung (Löser et al. 1986).

Zur Testung von soliden humanen Karzinomen wurde das in vivo Testmodell der nu/nu thymusaplastischen Nacktmaus herangezogen (siehe 2.1).

Von besonderem Interesse war dabei, wie sich die Steroidhormonrezeptoren unter der Therapie verhalten, bzw. ob sie am Ende der Therapie überhaupt noch nachweisbar sind.

Auch eine Abhängigkeit der Therapie vom ER- und PR-Gehalt der Tumoren war zu untersuchen. Zu diesem Zweck kamen drei humane Tumoren zum Versuch: Ein ER-negatives PR-negatives Mammakarzinom, ein ER-negatives PR-positives Ovarialkarzinom und ein ER-positives PR-positives Mammakarzinom.
Mit diesen Tumoren konnten fast alle Rezeptorkombinationen durchgespielt werden, um eventuell auftretende Abhängigkeiten der Therapie von den Rezeptoren aufzuzeigen.

2. DAS IN VIVO TESTMODELL DER NACKTMAUS

2.1 Versuchstiere

Bereits 1966 (Flanagan) wurde die Nacktmaus, ein immungenetisch defizientes Tier, beschrieben.
Bei dem Gendefekt handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Mutation auf dem Chromosom XI (Green 1981).

Der Gendefekt dieser Mausmutante, der unter anderem eine Thymushypoplasie (Pantelouris und Hair 1970) bedingt, ermöglicht dem Experimentator ohne immunsuppressive Maßnahmen wie Ganzkörperbestrahlung, Kortikoidapplikation und Antilymphozytenseren, Fremdgewebe ohne Abstoßungsreaktion zu transplantieren.

Durch die Hypoplasie des Thymus findet keine abschließende Prägung der T-Lymphozyten statt (Sato et al. 1976).

Somit hat das Tier keine funktionellen T-Lymphozyten. Pre-T-Zellen (prethymic-cells, T-Zell-Vorläufer) können jedoch nachgewiesen werden und spielen, hinsichtlich der verbliebenen Abwehr, eine bedeutende Rolle (Gershwin und Castles 1981).

Die Population der NK-Zellen ("natural killer cells"), die in der nu/nu Maus nachgewiesen werden, scheint mit der der pre-T-Zellen identisch zu sein. Durch die fehlende Differenzierung akkumulieren diese in Thymus und Milz der nu/nu Maus (Holden et al. 1978, Tamaoki et al. 1982).

Bei der Nacktmaus ist das System der B-Lymphozyten, hinsichtlich seiner Lebensdauer und immunologischen Funktion, nicht beeinträchtigt (Kindred 1979).

Zur Frage der Transplantationsfähigkeit von Tumoren bemerkten Ohsawa et al. (1977), daß grundsätzlich maligne ebenso wie benigne Tumoren transplantabel sind.
Jedoch ist die Angehrate bei malignen Tumoren größer.

Rygaard und Povlsen (1969) waren als erste erfolgreich bei der Transplantation und Passagierung eines humanen Kolonkarzinoms.

In den vorliegenden Transplantationsexperimenten wurden weibliche, sechs Wochen alte Tiere des Stammes "Swiss" verwendet. Die Tiere wurden vom Max-Planck-Institut, Martinsried b. München, bezogen.

2.2 Standardisierung der Experimente

Eine Standardisierung der Tierversuchsbedingungen ist die Voraussetzung der Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse (Fortmeyer 1979).
Dabei fordert das Nacktmausmodell spezielle Bedingungen, die von Fortmeyer und Bastert (1981) und von Sharkey und Fogh (1984) beschrieben worden sind.

2.2.1 Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von 26 - 28 ^{0}C (Ediger und Giovanella 1978) gehalten.
Der durch das fehlende Haarkleid bewirkte stärkere Flüssigkeitsverlust, wurde durch eine relative Luftfeuchtigkeit von 60 -80 % (Fortmeyer 1981) ausgeglichen.

Die Versuchsgruppen wurden in Kollektiven zu je fünf Tieren in Makrolonkäfigen Typ 2 mit entstaubter Einstreu gehalten.

Käfige, Deckel, Wasserflaschen und Mundstücke wurden zweimal wöchentlich gewechselt und im Autoklaven sterilisiert.

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden die Tiere in Laminar-Air-Flow Regalen (Altromin, Lage Lippe, BRD), bei einer permanenten Strömungsgeschwindigkeit von ca. 0,45 m/s, regalauswärts, gehalten.

2.2.2 Tierfütterung

Die Tiere erhielten eine pelletierte Spezialdiät der Firma Altromin, Lage Lippe (Nr. 1414 tpf) nach Fortmeyer und Bastert (1981) die dem erhöhten Grundumsatz der Tiere angepaßt war.

Um der erhöhten Infektanfälligkeit vorzubeugen, wurde das Trinkwasser mit 1 N HCl angesäuert (pH 2,5 - 3,0) (McPherson 1963, Thunert und Heine 1975).

Darüberhinaus wurde 1 Tablette Celasin-Stress, Boehringer Ingelheim (vitaminisiertes Breitspektrum Antibiotikum, 300 mg Oxytetracyclin), pro Liter Trinkwasser zugesetzt.

Zur Konservierung wurden außerdem 1500 mg/l Sorbinsäure in das Trinkwasser gegeben.

3. CHARAKTERISIERUNG DER TUMOREN

3.1 Herkunft des Transplantationsmaterials

Der Tumor 1 ist 1984 unter der Bezeichnung "CM 1" beschrieben worden (Staab und Anderer 1984).

Der Tumor 2 ist unter der Bezeichnung "XF-550" im Schrifttum aufgeführt (PD Dr. H. H. Fiebig, persönliche Mitteilung).

Der Tumor 3 ist als "T61" beschrieben und wurde von Herrn PD Dr. med. vet. H. P. Fortmeyer, zur Verfügung gestellt.

3.2 Klassifikation der Tumoren

3.2.1 Histologische Klassifikation

Für die Beurteilung des Ovarialkarzinoms wurde die Arbeit von Servo et al. (1973), für die Mammakarzinome die von Hartmann et al. (1978) herangezogen.

Für die Versuche wurden folgende Karzinome auf Nacktmäuse transplantiert:

Tumor 1 Mammatumor:	"CM 1"	(siehe Abb.3 und 4) polymorphzelliges Komedokarzinom
Tumor 2 Ovarialtumor:	"XF 550"	(siehe Abb.5 und 6) solides undifferenziertes Karzinom
Tumor 3 Mammatumor:	"T 61"	(siehe Abb.7 und 8) solides medulläres polymorphzelliges Karzinom

Abb. 3: Polymorphzelliges Komedokarzinom der Mamma (Tumor 1). Unterschiedlich breite solide trabekuläre Epithelkomplexe mit landkartenförmigen Tumornekrosen (oben Mitte, rechts oben). Zwischen den Tumorverbänden: schmale gefäßführende Stromasepten ohne wesentliche Rundzellinfiltrate. Vergr. 80fach, Färbung HE.

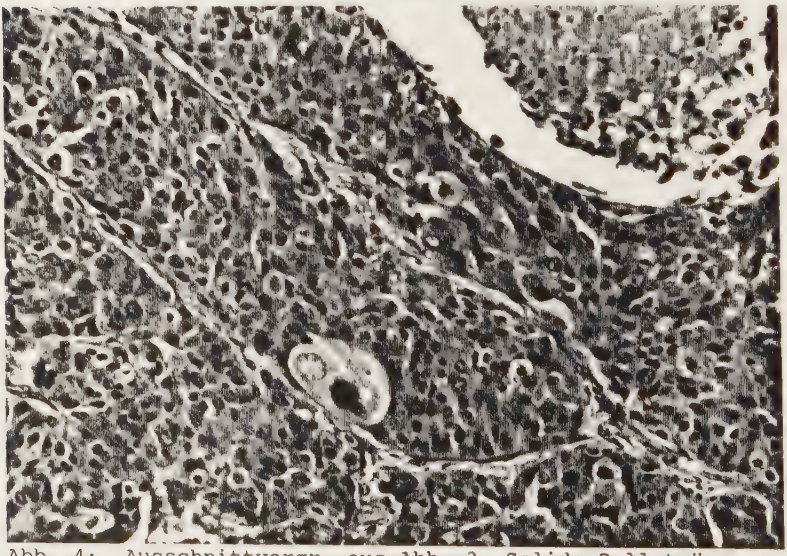


Abb. 4: Ausschnittvergr. aus Abb. 3. Solide Zellstränge deutlich atypischer Tumorzellen mit zahlreichen, teilweise atypischen Mitosefiguren und gelegentlicher Ausbildung von Tumorriesenzellen (z.B. Bildmitte). Umschriebenes Nekroseareal mit Detritus und Kernschutt (rechts oben). Vergr. 200fach, Färbung HE.

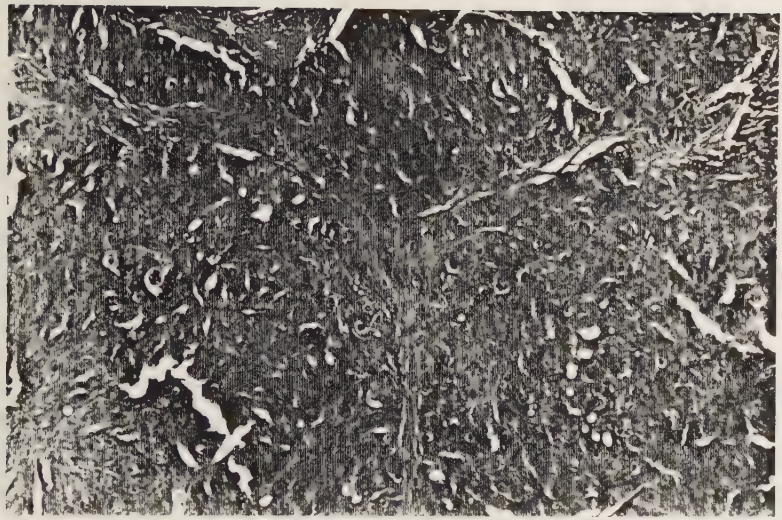


Abb. 5: Solides undifferenziertes Ovarialkarzinom, z.T. mit technisch bedingten kleineren Rißartefakten (Tumor 2). Große unregelmäßig begrenzte Zellkomplexe, von unterschiedlich breiten kollagenen Faserkomplexen unterteilt. Vergr. 80fach, Färbung HE.

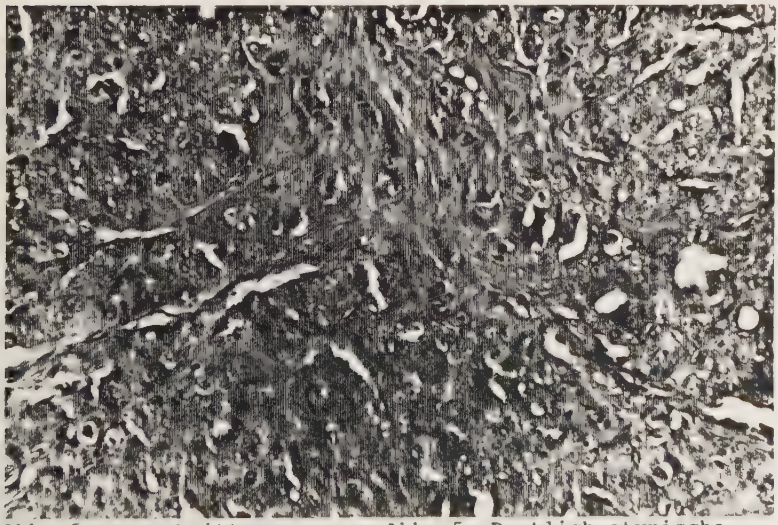


Abb. 6: Ausschnittvergr. aus Abb. 5. Deutlich atypische polygonale Tumorzellen mit großen bläschenförmigen Kernen mit Makronukleolen und zahlreichen Mitosen z.T. mit atypischen Teilungsfiguren. Vergr. 200fach, Färbung HE.

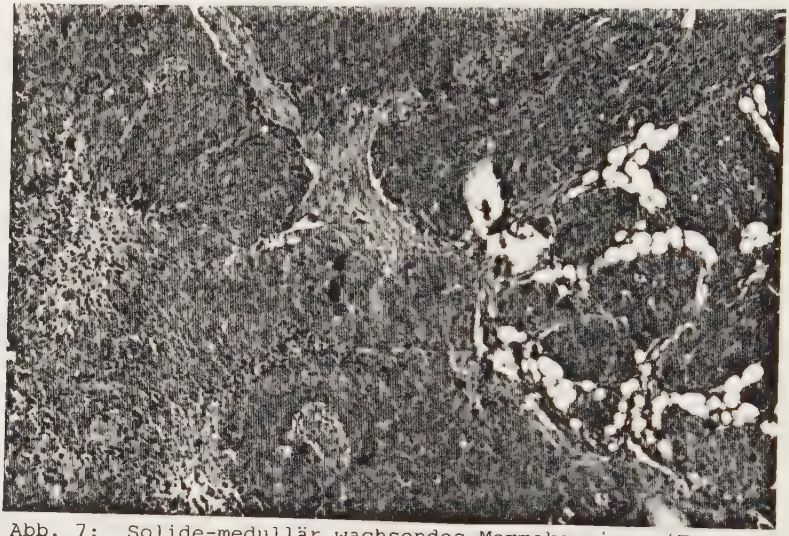


Abb. 7: Solide-medullär wachsendes Mammakarzinom (Tumor 3). Breite herdförmig nekrotische epitheliale Tumorkomplexe mit knotiger Infiltration des präexistierenden Fettgewebes (rechts im Bild). Im Tumorbereich unterschiedlich breite kollagene Fasersepten ohne nennenswerte lympho-plasmazelluläre Stromainfiltration. Vergr. 80fach, Färbung HE.

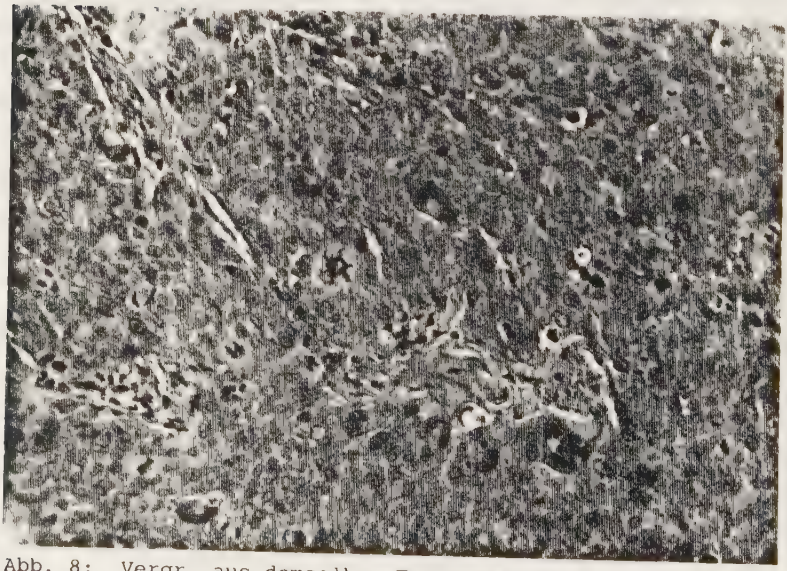


Abb. 8: Vergr. aus demselben Tumor wie Abb. 7. Kompakte Tumorzellverbände ohne erkennbare drüsige Differenzierung. Tumorzellen mit deutlicher Pleomorphie der Zell- und Kernteilungsfiguren. Vergr. 200fach, Färbung HE.

3.2.2 Rezeptorstatus

Die Einteilung der Tumoren nach positivem bzw. negativem Rezeptorstatus erfolgte nach dem international üblichen Standard. Hierbei wurden Tumoren, mit einem Rezeptorproteingehalt von weniger als 10 fmol/mg Protein (P) als negativ und mit einem Rezeptorgehalt von mehr als 10 fmol/mg P als positiv klassifiziert. Die exakten Rezeptorgehalte sind der Tabelle "III. EIGENE UNTERSUCHUNG, 6.2 Rezeptoren" zu entnehmen.

Tumor 1	Rezeptorstatus:	Estrogenrezeptor:	negativ
		Progesteronrezeptor:	negativ
Tumor 2	Rezeptorstatus:	Estrogenrezeptor:	negativ
		Progesteronrezeptor:	positiv
Tumor 3	Rezeptorstatus:	Estrogenrezeptor:	positiv
		Progesteronrezeptor:	positiv

3.2.3 Biochemische Klassifikation

Nach Abschluß der Therapie der Nacktmäuse mußte das humane Gewebe in den Xenotransplantaten als solches identifiziert werden, um ein Überwachsen mit Mausgewebe auszuschließen. Dieses Überwachsen ist verschiedene Male beschrieben worden (Wright et al. 1981, Slagel et al. 1982, Staab et al. 1983) und resultiert z.B. aus einer Hybridisierung des menschlichen Tumors mit Mausgewebe (Kömpf et al. 1984).
Zur Identifikation bieten sich Enzyme an, die im Organismus von Mensch und Maus die gleichen biochemischen Reaktionen katalysieren. Jedoch unterscheidet sich die Primärstruktur dieser Proteine bei den diversen Spezies erheblich voneinander, da die Aminosäurensequenzen genetisch determiniert und daher typisch für jede Spezies sind.
Somit ist es möglich die Enzyme mit entsprechenden biochemischen Methoden zu differenzieren und bei verschiedenen Isotypen auch phänotypisch zu charakterisieren.
Von besonderem Interesse ist hierbei, ob eine antiestrogene Therapie Einfluß auf die phänotypische Expression eines Enzyms ausübt.

Es wurden Isoenzymanalysen von mit und ohne Droloxifen behandelten menschlichen Tumoren auf Nacktmäusen durchgeführt, die aus den Experimenten der Tumoren 1, 2 und 3 stammten.

Die Untersuchungen umfaßten 22 verschiedene Markersysteme, deren Genorte auf 12 verschiedenen menschlichen Chromosomen lokalisiert sind. Homogenate von Tumorstücken vor Therapie, nach Therapie und einer Kontrolle, wurden mit der Stärkegelelektrophorese und mittels Isoelektrischer Fokussierung aufgetrennt. Anschließend sind mit spezifischen, biochemischen Färbemethoden die Isoenzyme zur Darstellung gebracht worden.

Die nachfolgende Dokumentation (siehe 6.3.1) umfaßt die phänotypische Charakterisierung der Tumoren und die Darstellung der Enzymexpression der Isoenzyme der Laktat-Dehydrogenasen (E.C. 1.1.1.27), Aspartat-Aminotransferasen (E.C. 2.6.1.1), Guanylat-Kinasen (E.C. 2.7.4.8) und Phosphogluco-Mutasen (E.C. 2.7.5.1).

4. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

4.1 Transplantationstechnik

Bereits Bastert (1976) konnte zeigen, daß die Angehrate von Xenotransplantaten im wesentlichen vom Transplantationsort und der Technik abhängt.
Die im folgenden beschriebene Implantationstechnik hat sich bewährt und garantiert eine optimale Angehrate (Staab, persönliche Mitteilung und Demonstration).

Nach Tötung und Hautdesinfektion der Spendertiere wurden die Tumoren unter aseptischen Bedingungen entnommen. Die frisch entnommenen Tumorstücke wurden von anhaftendem Fett befreit und zerteilt.

Bei den Tumoren 1 und 2 standen durch vorangegangene selbst durchgeführte Passagierung der Tumoren, circa 2 x 5 x 5 mm große Stücke zur Verfügung. Der Tumor 3 wurde nicht passagiert, sondern direkt aus den primären Spendertieren transplantiert. Somit standen nur etwa 2 x 2 x 2 mm große Transplantate zur Verfügung.

In Ethernarkose wurden die Tiere an der Inzisionsstelle mit Alkohol (70 %) desinfiziert. Lateral am Thorax wurde ein etwa 1 cm langer dorso-ventraler Schnitt in Höhe der vorletzten Rippe gesetzt. Subkutan wurde nun mit einer Schere nach kranial präpariert, um das Transplantat in dieser Tasche zu deponieren. Der Wundverschluß erfolgte mit Michel-Klammern (11 x 2 mm, Aesculap), welche 7 Tage post operationem wieder entfernt wurden.

Der Implantationsort, lateral am Thorax, gewährleistet eine rasche Vaskularisierung. Die während der Versuchsreihen tranplantierten Tumoren gingen, bis auf einige Ausnahmen, alle an. Als vorteilhaft erwies sich die leicht durchführbare Adspektion und Vermessung der Tumoren an der lateralen Thoraxwand.

Da es sich bei den Ethernarkosen um sehr kurze Narkosen handelte, wurde sie von den nu/nu Mäusen ausnahmslos toleriert.

4.2 Bestimmung des Tumorvolumens

Die Tumoren wurden mit einer Schublehre nach Entfernung der Klammern durch die Haut hindurch vermessen.

Das Tumorwachstum wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$V = \left[\left(\frac{\Pi}{6}\right)\cdot a^2\cdot b\right] cm^3$$

a: kleinster Durchmesser (cm)

b: auf a senkrecht stehender größter Durchmesser (cm)

Diese Formel wurde aufgrund des ellipsoiden Wachstumsverlaufes der Tumoren verwendet (Staab und Anderer 1982). Nach einer anfänglich registrierten Wachstumsdepression (lag-Phase) proliferierten die Tumoren recht deutlich. Nach Erreichen der log Phase, wurde mit der Therapie begonnen.

4.3 Therapieschema

Bei den Tumoren 1 und 3 erfolgte der Beginn der Therapie am Tag 9. Beim Tumor 2 wurde 14 Tage nach der Tranplantation mit der Therapie begonnen.
Es wurden wöchentlich Tumoren entnommen, mit Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -70 ^{0}C bis zur späteren Rezeptorbestimmung aufbewahrt.

Die Therapiedauer betrug bei

Tumor 1	31 Tage
Tumor 2	28 Tage
Tumor 3	26 Tage

Nach Ende der Therapie wurden die behandelten Tiere und die Kontrolltiere getötet, die Tumoren entnommen und gelagert (siehe oben).

4.4 Dosierung

Die Dosierung des Antiestrogens wurde auf 100 mg/kg KG pro Tag festgesetzt. In internen, in der KLINGE PHARMA München durchgeführten Versuchen, erwies sich dies als die am höchsten einsetzbare Dosis ohne toxische Reaktionen (siehe II. 3.4) und maximaler antiestrogener Wirkung (KLINGE PHARMA München, interne Dokumentation).
Fortmeyer (persönliche Mitteilung) beobachtete bei der 100 mg/kg KG Dosis ebenfalls die günstigsten antiestrogenen Effekte.

Die Substanz wurde in Agar gelöst und mußte wöchentlich neu angesetzt werden. Sie wurde lichtgeschützt bei 4 ^{0}C aufbewahrt. Pro Maus (Durchschnittsgewicht 25 g) wurden täglich 0,25 ml einer einprozentigen Lösung appliziert. Eine Überbelastung des Magens der Tiere konnte so vermieden werden.

4.5 Applikationsform

Das Medikament wurde stets morgens zwischen 9.00 Uhr und 10.00 Uhr per os, unter Zuhilfenahme einer Glasspritze, in den Oesophagus bzw. den Gaster appliziert.

5. V E R S U C H S A U S W E R T U N G

5.1 Quantitative Bestimmung der Estrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren

5.1.1 Aufbewahrung, Vorbereitung und Proteinbestimmung

Die exstirpierten Tumoren wurden von überschüssigem Fett befreit, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und sofort anschließend bei -70 ^{0}C aufbewahrt.

Zur Rezeptorbestimmung wurden Proben von mindestens drei Tieren pro Entnahmetag im Dismembrator (B. Braun, Melsungen) pulverisiert.

Das abgewogene Pulver wurde mit dem 10fachen Volumen eines Homogenisierungspuffers (100 µl Monothioglycerol + 900 µl Aqua dest) + 1,211 g Tris Base + 0,558 g EDTA (Dinatriumsalz, Dihydrat) + 1,210 g Natriummolybdat (Dihydrat) mit Aqua bidest auf 1000 ml aufgefüllt und auf pH 7,4 - 7,5 eingestellt verdünnt, und mit einem Gewebshomogenisator im Eis (2 - 8 ^{0}C) zerstoßen.

Das Homogenisat wurde 1 h bei 35000 rpm (100.000 x g) gekühlt (4 ^{0}C) zentrifugiert.
Nach der Überführung des Überstandes (= Zytosol) des Zentrifugates in gekühlte Gefäße wurde die Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry 1951) mit folgenden Modifikationen vorgenommen:

- Proteinstandards: O; 0,04; 0,08; 0,12; und 0,16 ml Rinder-Serumalbumin (1 mg/ml) in Aqua dest gelöst.

- Zu jedem Standard wurden 0,04 ml Homogenisierungspuffer hinzugefügt und mit Aqua dest auf 0,6 ml aufgefüllt.

- Für Zytosole mit einem Gehalt von ca. 1 - 2 mg Protein/ml sind 0,04 ml Zytosol + 0,56 Aqua dest verwendet worden.

- Ferner wurden 3,0 ml des Na_2CO_3/ NaOH/ $CuSO_4$/ NaK-Tartrat Reagens und 0,3 ml des 1 N Folin-Reagenzes angewandt.

- Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 500 nm. Das Zytosol wurde dann mit dem Homogenisierungspuffer auf 1,5 mg Protein/ml eingestellt.

5.1.2 Bestimmung der Estrogenrezeptoren mit einer enzymimmunologischen Methode

- Die gelösten Standards, Kontrollen und die nach der Lowry-Methode auf 1,5 mg/ml Protein verdünnten Proben (je 200 µl) sind daraufhin mit den Estrogen-Rezeptor-Antikörper (Ratte, monoklonal) beschichteten Kugeln (Abbott ER-EIA Monoclonal Test-Kit, Abbott Laboratories, Chicago U.S.A.), für 18 h bei 4 °C inkubiert worden.

- Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest wurden die Kugeln mit jeweils 200 ul Estrogen-Rezeptor Konjugat 60 Minuten im Wasserbad (37 °C) inkubiert.

- Die Herstellung der OPD (o-Phenylendiamin)-Lösung erfolgte nach den Angaben des Herstellers des Test-Kits.

- Nachdem die Kugeln weitere zwei mal mit Aqua dest gewaschen wurden, waren die Kugeln mit 300 ul OPD-Substratlösung versetzt, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 1 ml 1 N H_2SO_4 gestoppt.

- Die Extinktionen wurden nach 45 Minuten bei 492 nm gegen einen Nullwert (Aqua dest) gemessen.

- Laut Hersteller sollte der mittlere Extinktionswert des 250 fmol/ml Estrogen-Rezeptor-Standards über 0,8 liegen, um Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können.
  Er lag im Test durchschnittlich bei 1,159 und somit im Normbereich.

- Nach Erstellung der Standardeichkurve die durch Auftragen der Standardkonzentrationen (0; 5; 25; 100; 250 fmol/ml) gegen die zugehörigen Extinktionen erstellt wurde, konnten die Werte in fmol/ml Zytosol nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor abgelesen werden.
  Aus der Formel $\frac{\text{fmol ER / ml Zytosol}}{\text{mg Protein / ml Zytosol}}$
  (fmol ER = 10^{-15} x Molgewicht ER) wurde die Konzentration fmol ER/mg Zytosol-Protein berechnet. Bei allen Standards, Kontrollen und Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

5.1.3 Bestimmung der Estrogen- und Progesteronrezeptoren mit radioaktiv markierten Steroidhormonen

Die Probenentnahme und Aufbewahrung erfolgte wie bei 5.1.1. Nach Zugabe des doppelten Volumens TEMG-Puffer (Tris-HCl: 10 mM, EDTA: 1,5 mM, Mercaptoethanol: 6,0 mM, Glycerol: 10 %), welcher auf pH 7,4 eingestellt war, ist das Gemisch auf Eis (2 - 8 °C), in einem Gewebshomogenisator zerstoßen worden.
Das Homogenisat wurde 1 h bei 35000 rpm (100.000 x g) in der Kühlzentrifuge (4 °C) zentrifugiert.

Die Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry 1951), wurde nach der Überführung des Zytosols in gekühlten Gefäßen durchgeführt. Daraufhin wurde das Zytosol mit TEMG-Puffer, auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml Protein, eingestellt.

Einen Tag vor Durchführung des Tests wurden bereits Aliquots, von 10 µl den Steroidlösungen (Estradiol, R-5020, +/-DES, +/-Progesteron), in 1 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert.

Nach dem Abdampfen des Ethanols bei 4 ^{0}C, erfolgte die Zugabe von 100 µl des verdünnten Zytosols (2 mg/ml P).

Folgende verschiedene Konzentrationen der Steroidlösungen fanden sich nun nach der Inkubation des Zytosols.

Tabe. 3: Konzentrationen des Estrogens im Versuchsansatz (DES = unmarkiertes Estrogen)

^{3}H-Estrogen (nM)	DES (µM)
2.000	0.400
1.000	0.200
0.500	0.100
0.250	0.050
0.125	0.025

Tab. 4: Konzentrationen des Progesterons im Versuchsansatz (^{3}H-R-5020 = Synthetisches radioaktives Gestagen)

^{3}H-R-5020 (nM)	Progesteron (µM)
8.00	1.60
4.00	0.80
2.00	0.40
1.00	0.20
0.50	0.10

Die unspezifische Bindung wurde durch einen 200fachen Überschuß von unmarkiertem Hormon (DES, Progesteron) bestimmt.

Tab. 5: Komponenten im Versuchsansatz bei Konkurrenz ohne DES/Progesteron

Zytosol	^{3}H-Estrogen/ ^{3}H-R-5020
100 µl	10 µl

Tab. 6: Komponenten im Versuchsansatz bei Konkurrenz mit DES/Progesteron

Zytosol	^{3}H-Estrogen/ ^{3}H-R-5020	DES/ Progesteron
100 µl	10 µl	10 µl

Jede Probe wurde doppelt angesetzt. Nach der Inkubation über Nacht, erfolgte die Zugabe von 200 µl DCC-Suspension (Dextran-Coated-Charcoal-Suspension) in jedes Röhrchen. Nach 15minütigem Schütteln wurden die Proben bei 2000 x g 10 Minuten zentrifugiert.
Zur Zählung der Radioaktivität wurden 200 µl der inkubierten Proben verwendet.
Die Berechnung der Totalaktivität erfolgte, indem man je 50 µl + 8 ml Insta Gel (Szintillationscocktail zur Erfassung der Radioaktivität) der markierten Hormone und deren verschiedene Konzentrationen in der Radioaktivitätsmeßvorrichtung zählte.

Die Rezeptorproteinkonzentration war durch die Verwendung desselben Zytosols in allen Versuchssituationen mit markiertem und unmarkiertem Hormon (siehe Tab. 3 und 4) identisch. Daher wurde das Rezeptorprotein, je nach Konzentration, durch eine bestimmte Hormonkonzentration (markiert bzw. unmarkiert) abgesättigt. Ab diesem Zeitpunkt wurde kein Hormon (markiert bzw. unmarkiert) mehr an das spezifische Rezeptorprotein gebunden und lag nun als freies ungebundenes Hormon in der Versuchslösung vor. Somit ließ sich mit Hilfe der Bindungskapazität der Rezeptorgehalt ermitteln, da ein Molekül Hormon sich an ein Molekül Hormonrezeptorprotein bindet.

Die Ermittlung der Totalbindungskapazität (= spezifische + unspezifische Bindung) erfolgte durch Messung des Versuchsansatzes nach Tab. 5. Die spezifische Bindungkapazität errechnete sich durch Subtraktion der unspezifischen Bindungskapazität (siehe Tab. 3 u. 4) von der Totalkapazität (der 200fache Überschuß an unmarkiertem Hormon verdrängt markiertes Hormon aus seiner spezifischen, nicht aber aus seiner unspezifischen Bindung). Das freie ungebundene Hormon wurde durch die Zugabe der DCC-Suspension ermittelt.

Nachdem das Verhältnis von gebundenem zum freien Hormon auf der Ordinate einer Kurve und auf der Abszisse gebundenes Hormon (Mol) aufgetragen wurde, konnte mit dem Scatchard-Plot-Verfahren eine lineare Regressionslinie gezeichnet werden. Daraus ließ sich die Bindungskapazität bestimmen. Das konstante Verhältnis der Bindungskapazität zur Konzentration des Zytosolproteins (mg/ml) ermöglichte nun das Ablesen der Estrogen bzw. Progesteronrezeptorkonzentrationen.

5.2 Qualitative Bestimmung der Estrogenrezeptoren

5.2.1 Immunozytochemische Färbung der Estrogenrezeptoren

5.2.1.1 Paraffineinbettungstechnik

Die nach der Exstirpation mit Flüssigstickstoff schockgefrorenen und bei -70 °C gelagerten Tumorstücke sind in gefrorenem Zustand in gepuffertem Formalin (0,1 m Na_2HPO_4, pH 7,4 und 10 % Formalin) bei 4 °C 24 Stunden fixiert worden.
Nachdem sie 18 Stunden in 0,1 m Na_2HPO_4 bei 4 °C gespült wurden, erfolgte Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe nach folgendem Schema:

		Zeit in Std.
Alkohol	96 %	3,5
"	"	3,5
"	"	2
Alkohol	100 %	2
"	"	2
Methylbenzoat		3
"		7
"		3
Benzol		0,5

Nach der Paraffineinbettung sind 4 µm starke benachbarte Schnitte eines Tumors auf zwei, mit Glycerin-Eiweißgemisch vorbehandelte Objektträger aufgezogen worden. Die Schnitte wurden 45 Minuten in den Brutschrank bei 37 °C verbracht.

Anschließend erfolgte
eine 5minütige Deparaffinisierung in Xylol und
eine 5minütige Spülung in 100 % Ethanol.

Zur Herabsetzung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Schnitte 30 Minuten in ein Bad mit Methanol (100 %), das 0,3 % H_2O_2 enthielt, eingesetzt.

Dreimal je 5 Minuten wurden die Schnitte nun in PBS (0,01 m phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2-7,4) gespült.

Nach dem tropfenweisen Auftragen des blockierenden Reagenz zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der nachfolgenden Reagenzien, wurden die Schnitte 15 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert.

Der primäre Antikörper wurde zu dem einen Objektträger und der Kontrollantikörper zu dem anderen Objektträger der jeweiligen Probe hinzugefügt und 30 Minuten inkubiert. Nach zweimaliger 5minütiger Spülung mit PBS, wurde der brückenbildende Antikörper der die Verbindung zwischen dem Antikörper gegen ER und dem PAP-Komplex herstellt, aufgeträufelt und 30 Minuten inkubiert.

Nach zweimaligem 5minütigen Waschen mit PBS, folgte das Auftragen des PAP- Komplexes und 30minütige Inkubation. Vor Hinzugabe der Chromagen-Substrat-Lösung und 6minütiger Inkubation wurde zweimal je 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Die Objektträger wurden danach 5 Minuten in Aqua dest gewässert und anschließend 5 Minuten mit 1 %igem (V/V) Harris-Hämatoxylin gegengefärbt.

Nach einer Spülung (5 Minuten) mit Leitungswasser wurden die Schnitte jeweils zweimal je zwei Minuten in ein Gefäß mit Ethanol (95 %) gestellt. Dies wurde mit 100 %igem Ethanol wiederholt.

Dasselbe Verfahren wurde mit Xylol durchgeführt. Auf jedes Deckglas wurde ein Tropfen Fixiermedium gegeben. Die Schnitte sind einzeln aus dem Xylolbad genommen worden und konnten, von dem Deckglas bedeckt, nach 10 Minuten begutachtet werden.

5.2.1.2 Gefrierschnittechnik

Die Tumorentnahme und Einfrierung in einem Kryostat, erfolgte unverzüglich nach Tötung des tumortragenden Tieres.
Aus dem tiefgefrorenen Tumorgewebe wurden nun zwei benachbarte Schnitte von ca. 4 - 6 Mikron auf zwei separate, mit Gewebekleber (Abbott Laboratories, Chicago) vorbehandelte, Objektträger aufgezogen.

Unmittelbar nach diesem Vorgang, sind die Schnitte für ca. 12 Minuten in 3,7 %iges Formaldehyd-PBS (0,01 m Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2-7,4), gelegt worden.

Nach Überführung der Objektträger für 4 Minuten in kaltes Methanol (-20 °C) und anschließend 2 Minuten in kaltes Aceton (-20 °C), wurden die Objektträger 6 Minuten in PBS bei 20 °C, gespült.
Die Schnitte wurden nun noch dreimal je 5 Minuten in PBS gespült.
Das weitere Vorgehen war nun mit dem Ablauf unter 5.2.1.1 identisch.

Mit dem unter 5.2.1.1 geschilderten Paraffineinbettungsverfahren konnte bei sechs verschiedenen Ansätzen keine Färbung von Estrogenrezeptoren erzielt werden.

Beim Gefrierschnitt (5.2.1.2) dagegen wurde die Färbung der Estrogenrezeptoren erreicht (siehe Abb. 14 und 15).

5.3 Statistik

Die Wachstumskurven wurden unter Verwendung der Originalmeßdaten (siehe VIII. ANHANG) bzw. deren arithmetischen Mittelwerten (siehe 6.1 Wachstumskurven u. Tabellen) erstellt.
Die statistische Auswertung der Wachstumskurven erfolgte mit dem Student s T-Test (zweiseitig) für unverbundene Stichproben. Dabei wurden an den jeweiligen Messpunkten (= Messtage) die Werte des Therapiekollektivs mit denen des Kontrollkollektivs verglichen.

6. E R G E B N I S S E

6.1 Wachstumskurven und Tabellen

6.1.1 Tumor 1

6.1.1.1 Tabelle und Statistik

Aus der vorliegenden Kurve (Abb. 9) und der Tabelle (Tab. 7) läßt sich ein annähernd gleicher Wachstumsverlauf der Kontroll- und der Therapiegruppe erkennen. Statistisch lassen sich keine signifikanten Unterschiede ablesen.
Bei diesem (ER-, PR-)-Tumor konnte durch Droloxifen keine Einflußnahme auf das Tumorwachstum erzielt werden.

Tab. 7: Tabellarischer Vergleich des mittleren Tumorwachstums (%) des Kontrollkollektivs (K) und des Therapiekollektivs (T), anhand des mittleren Tumorvolumen (ccm), sowie die Erfassung der Stichprobengröße (n), der Standardabweichung und der Irrtumswahrscheinlichkeit (P) des Tumors 1.

Messtage	n		Mittleres Tumorvolumen in ccm		Mittleres Tumorwachstum in %		Standardabweichung		P
	T	K	T	K	T	K	T	K	
0	25	8	0,17	0,16	100	100	0,06	0,1	N.S.
9	Therapiestart								
17	21	4	0,49	0,37	288	231	0,16	0,12	N.S.
27	9	4	1,5	1,3	882	813	0,82	0,31	N.S.
37	6	4	3,4	2,9	2000	1813	1,2	0,62	N.S.

N.S. = Nicht signifikant ($p > 0,05$)

6.1.1.2 Wachstumskurve

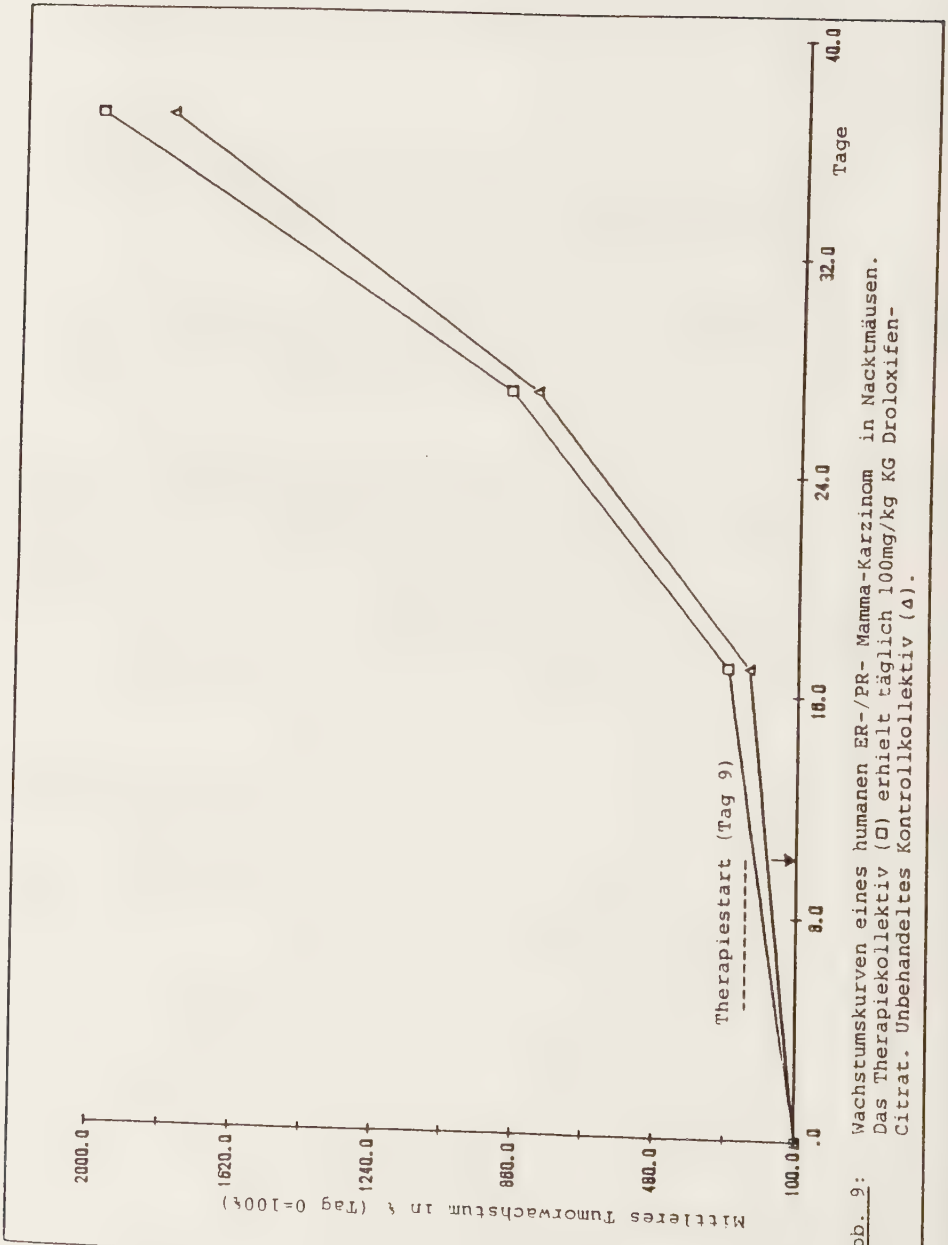


Abb. 9: Wachstumskurven eines humanen ER-/PR- Mamma-Karzinom in Nacktmäusen. Das Therapiekollektiv (□) erhielt täglich 100mg/kg KG Droloxifen-Citrat. Unbehandeltes Kontrollkollektiv (Δ).

6.1.2 Tumor 2

6.1.2.1 Tabelle und Statistik

Die vorliegende Kurve (Abb. 10) und Tabelle (Tab. 8) lassen bis zum 25. Messtag annähernd gleiche Wachstumsverläufe der Kontroll- und Therapiegruppe erkennen. Vom 25. bis zum 42. Messtag jedoch, zeigt die Kontrollgruppe statistisch eine signifikant ($p \leq 0{,}05$) stärkere Volumenzunahme der Tumoren, gegenüber der Therapiegruppe. Am 42. Messtag zeigte sich kein signifikanter Unterschied mehr.
Bei diesem (ER-, PR+)-Tumor kann ab dem 25. bis zum 42. Messtag eine Stagnation der Volumenzunahme des Tumors durch Droloxifen beobachtet werden.

Tab. 8: Tabellarischer Vergleich des mittleren Tumorwachstums (%) des Kontrollkollektivs (K) und des Therapiekollektivs (T), anhand des mittleren Tumorvolumen (ccm), sowie die Erfassung der Stichprobengröße (n), der Standardabweichung und der Irrtumswahrscheinlichkeit (P) des Tumors 2.

Messtage	n		mittleres Tumorvolumen in ccm		mittleres Tumorwachstum in %		Standardabweichung		P
	T	K	T	K	T	K	T	K	
0	3	10	0,13	0,19	100	100	0,05	0,09	N.S.
14	T h e r a p i e s t a r t								
17	28	5	0,11	0,21	89	111	0,09	0,15	N.S.
25	21	5	0,18	0,42	138	221	0,14	0,21	0,05
29	17	5	0,25	0,49	192	258	0,16	0,23	0,05
36	16	5	0,58	1,10	446	579	0,35	0,48	0,05
42	6	5	0,86	1,30	662	684	0,46	0,67	N.S.

N.S.= Nicht signifikant ($p > 0{,}05$)

6.1.2.2 Wachstumskurve

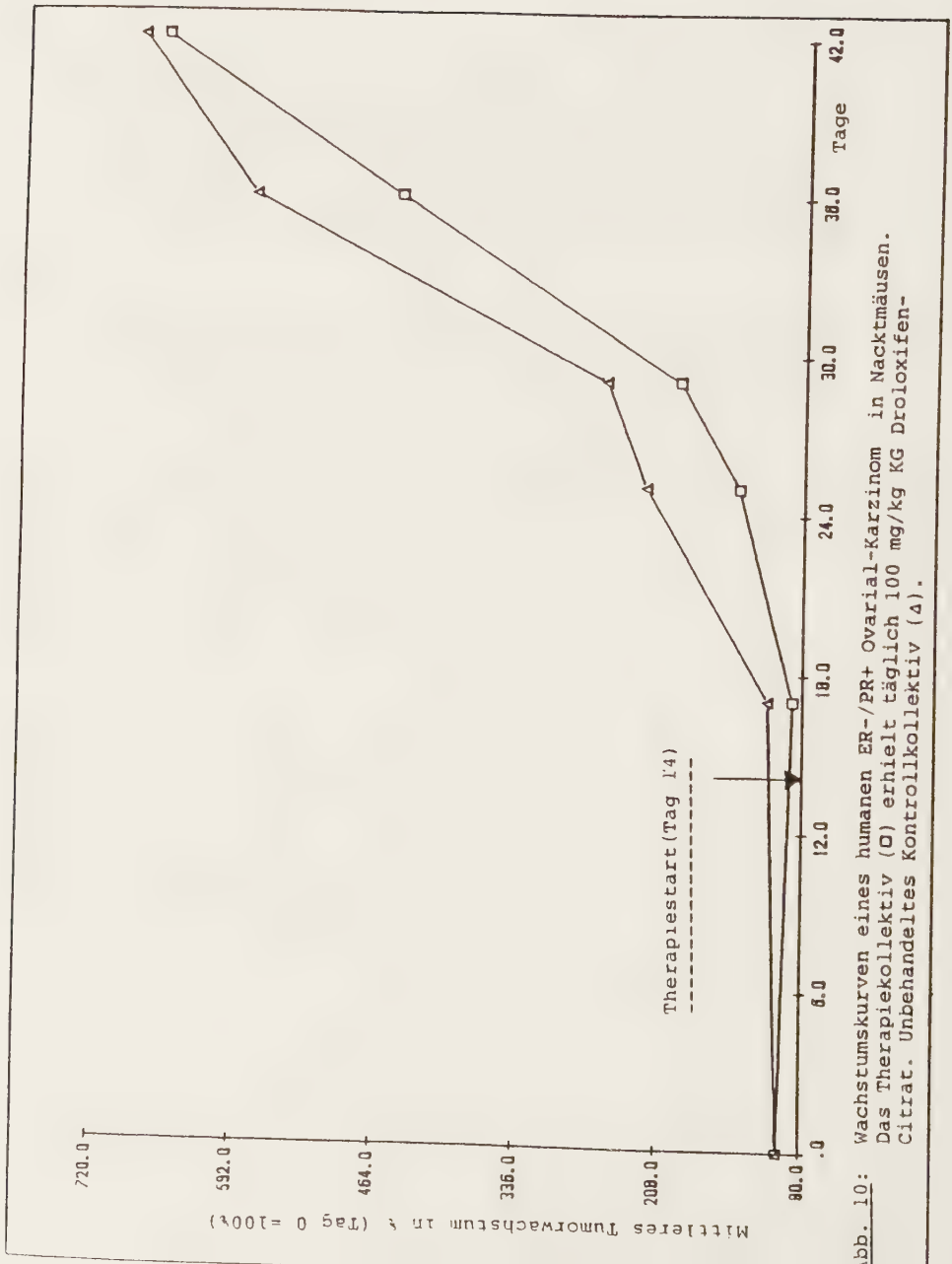


Abb. 10: Wachstumskurven eines humanen ER-/PR+ Ovarial-Karzinom in Nacktmäusen. Das Therapiekollektiv (□) erhielt täglich 100 mg/kg KG Droloxifen-Citrat. Unbehandeltes Kontrollkollektiv (Δ).

6.1.3 Tumor 3

6.1.3.1 Tabelle und Statistik

Obwohl das Tumorvolumen der Therapiegruppe zum Zeitpunkt des Therapiestarts erheblich über dem der Kontrollgruppe lag (siehe Abb. 11 und Tab. 9), flachte die Wachstumskurve der Therapiegruppe deutlich ab und lag am letzten Messtag (35) statistisch signifikant unter der Kontrollgruppe (p 0,02).

Tab. 9: Tabellarischer Vergleich des mittleren Tumorwachstums (%) des Kontrollkollektivs (K) und des Therapiekollektivs (T) anhand des mittleren Tumorvolumen (ccm), sowie die Erfassung der Stichprobengröße (n), der Standardabweichung, und der Irrtumswahrscheinlichkeit (P) des Tumors 3.

Messtage	n T	n K	mittleres Tumorvolumen in ccm T	mittleres Tumorvolumen in ccm K	mittleres Tumorwachstum in % T	mittleres Tumorwachstum in % K	Standardabweichung T	Standardabweichung K	P
0	2	11	0,09	0,11	100	100	0,06	0,0	N.S.
9	Therapiestart								
9	25	11	0,30	0,23	330	253	0,30	0,23	N.S.
18	16	11	0,32	0,37	356	396	0,32	0,37	N.S.
25	12	11	0,42	0,48	446	436	0,29	0,22	N.S.
35	6	8	0,63	1,23	700	1118	0,20	0,61	0,02

N.S. = Nicht signifikant (p > 0,05)

6.1.3.2 Wachstumskurve

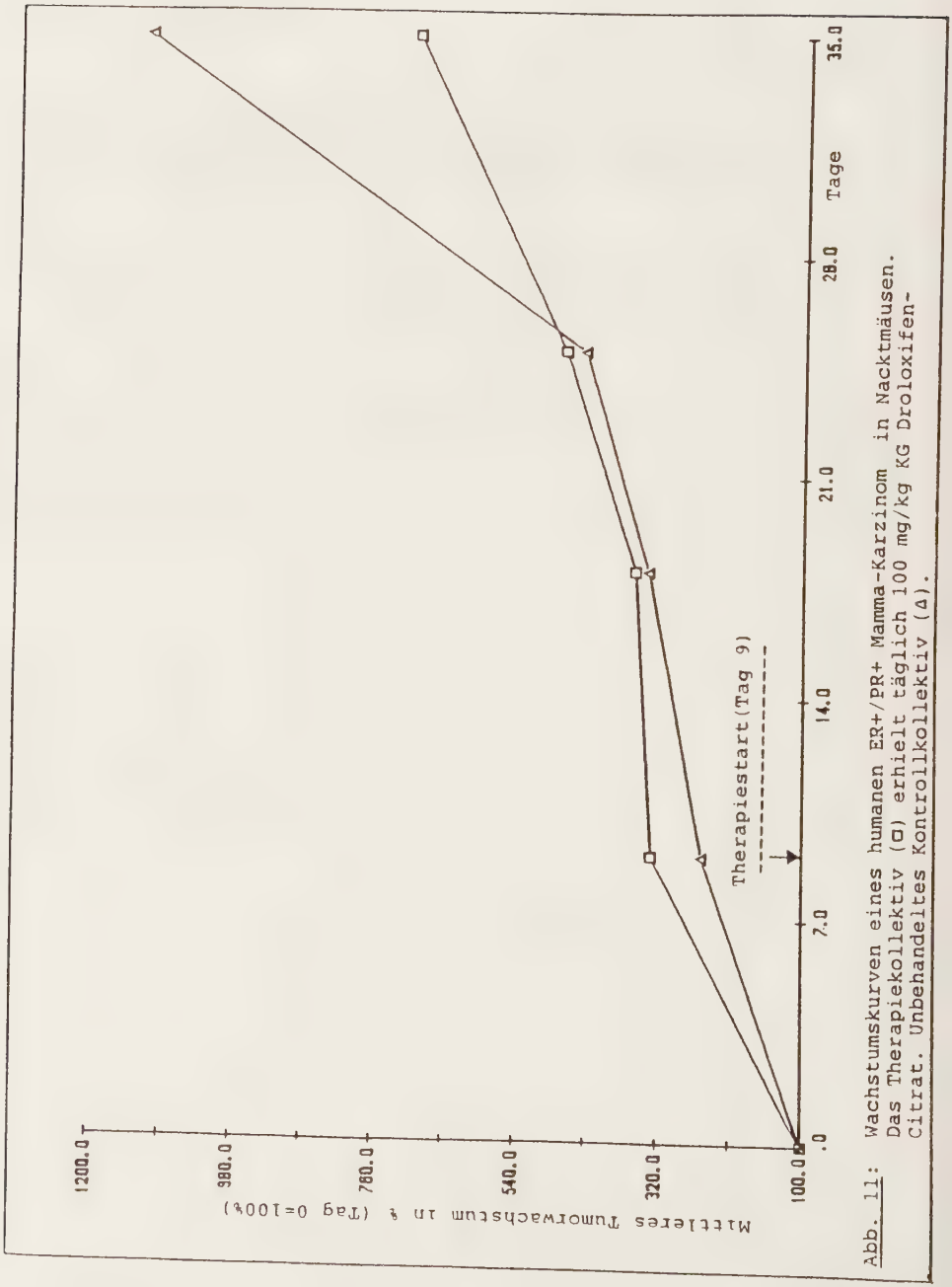


Abb. 11: Wachstumskurven eines humanen ER+/PR+ Mamma-Karzinom in Nacktmäusen. Das Therapiekollektiv (□) erhielt täglich 100 mg/kg KG Droloxifen-Citrat. Unbehandeltes Kontrollkollektiv (Δ).

6.2 Rezeptoren

Die Rezeptorbestimmungen zeigten zum Teil überraschende Befunde (Tab. 10).

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, lassen sich für den Tumor 1 weder Estrogenrezeptoren (EIA, DCC) noch Progesteronrezeptoren zu irgendeinem Zeitpunkt des Experimentes nachweisen.

Beim Tumor 2 lassen sich keine Estrogenrezeptoren (EIA, DCC) nachweisen. Der Progesteronrezeptorgehalt fällt auf weniger als 50 % des Anfangsgehaltes gegen Ende des Experimentes ab. Dieser Befund ist insofern von Interesse, als auch am Ende des Experimentes der Therapieerfolg (= Stagnation des Volumenwachstums) absinkt und sich daher möglicherweise auch eine experimentelle Abhängigkeit der Therapie auch vom Progesteronrezeptorgehalt zeigen läßt.

Der interessanteste Befund wird mit dem Tumor 3 verzeichnet. Die Estrogenrezeptor-Nachweismethode mit dem DCC-Test läßt einen stetigen Abfall des Gehaltes an Rezeptorprotein erkennen. Der Abfall des Rezeptorgehaltes ist durch die Besetzung der Rezeptoren mit dem Antiestrogen ("Droloxifen") zu erklären, die der funktionelle Bindungstest, der nur auf freie Estrogenrezeptoren anspricht, nicht messen kann.
Der tatsächliche ER-Gehalt wurde mit dem EIA ermittelt, der unabhängig von freien Rezeptorstellen immunologisch den Gehalt an ER-Protein mißt. Demzufolge fand ein Anstieg (> 100 %) und gegen Ende ein leichter Abfall an ER statt. Der Gehalt an ER-Protein war mit Ausnahme der ersten Woche stets höher als beim DCC-Test. Die Kontrollen wiesen identische ER-Konzentrationen auf. Der Progesteronrezeptorgehalt dagegen fiel im Verlauf des Experimentes kontinuierlich ab.

Tab. 10: Rezeptorgehalte der untersuchten Tumoren

	Rezeptorgehalt in fmol/mg Protein				
	PR	ER			
	DCC	EIA	DCC		
Tumor 1	0	0	0	vor Therapiebeginn	
	0	0	0	1	Woche nach Therapiebeginn
	0	0	0	2	Wochen "
	0	0	0	3	Wochen "
	0	0	0	4	Wochen "
	0	0	0		Kontrolle
Tumor 2	16	0	0	1	Woche nach Therapiebeginn
	15	0	0	2	Wochen "
	10	0	0	3	Wochen "
	7	0	0	4	Wochen "
	14	0	0		Kontrolle
Tumor 3	18	20	25	1	Woche nach Therapiebeginn
	16	28	23	2	Wochen "
	14	43	20	3	Wochen "
	12	33	19	4	Wochen "
	22	35	35		Kontrolle

PR = Progesteronrezeptorprotein

ER = Estrogenrezeptorprotein

EIA = Enzyme Immuno Assay

DCC = Dextran Coated Charcoal

6.3 Isoenzyme

6.3.1 Phänotypische Charakterisierung der untersuchten Tumoren

Die analysierten 22 Enzymloci sind auf 12 verschiedenen Chromosomen lokalisiert (siehe Tab. 11).

Tab.11: Auflistung der analysierten Enzyme mit vollständiger Nomenklatur und E.C.-Nummer (aus: International Union of Biochemistry, Nomenclature Committee, Enzyme Nomenclature, 1978):

Chromosom	Enzymname		E.C. Nummer
1	FUCA	(Fucosidase A)	3.2.1.51
	UMPK	(Uridin-Mono-Phosphat-Kinase)	2.4.2.9
	PGM 1	(Phospho-Gluco-Mutase 1)	2.7.5.1
	GUK	(Guanylat-Kinase)	2.7.4.8
2	ME 1	(Malic Enzyme 1)	1.1.1.38
	ME 2	(Malic Enzyme 2)	1.1.1.38
	GLO	(Glyoxalase)	4.4.1.5
	PGM 3	(Phospho-Gluco-Mutase 3)	2.7.5.1
3	ALT	(Alanin-Amino-Transferase)	2.6.1.2
	AK 1	(Adenylat-Kinase 1)	2.7.4.3
	ALAD	(Delta-Amino-Lävulinat-Dehydratase)	4.2.1.24
4	AST 1	(Aspartat-Amino-Transferase)	2.6.1.1
5	LDH-A	(Laktat-Dehydrogenase A)	1.1.1.27
6	LDH-B	(Laktat-Dehydrogenase B)	1.1.1.27
7	ESD	(Esterase D)	3.1.1.1
8	PK	(Pyruvat-Kinase)	2.7.1.40
9	PGP	(Phospho-Glykolat-Phosphatase)	3.1.3.18
	AST 2	(Aspartat-Amino-Transferase)	2.6.1.1
10	PEPA	(Peptidase A)	3.4.23.6
11	PGI	(Phospho-Glucose Isomerase)	5.3.1.9
12	ADA	(Adenosin Desaminase)	3.5.4.4
	SAHH	(S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase)	3.3.1.1

Es wurden 16 polymorphe Systeme untersucht. In 5 Systemen ergaben sich phänotypische Unterschiede zwischen den Tumoren, die nachfolgend tabellarisch zusammengefaßt sind.

Tab. 12: Phänotypische Differenzierung der Tumoren 1, 2 und 3. Die Enzyme waren homozygot (1, 2), heterozygot (2-1), nicht getestet (n.t. = not tested). Bei der ALT der Tumoren 1 und 2 konnte keine eindeutige (?) Enzymexpression festgestellt werden.

Systeme/Tumoren	1	2	3
FUCA	2-1	1	n.t.
GLO	2	1	2-1
ME 2	2-1	1	2
PGP	1	1	2-1
ALT	?	?	1

Keine Enzymexpression fand sich in den Systemen der Delta-Aminolävulinat Dehydratase (ALAD) und der erythrozytären Adenylat-Kinase (AK1).

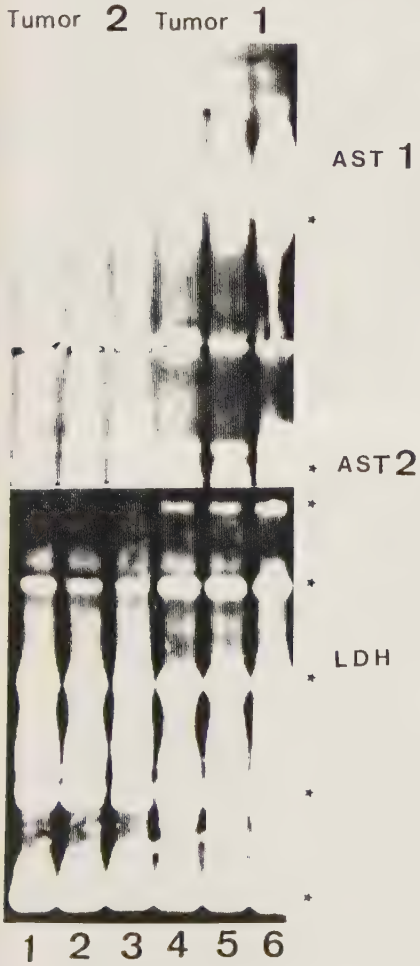
Zusätzlich wurden 5 nicht polymorphe Isoenzymsysteme analysiert: Guanylat-Kinase (GUK), Laktat-Dehydrogenasen (LDH A, LDH B), Pyruvat-Kinasen (PK), zytoplasmatische Aspartat-Amino-Transferase (AST 1), zytoplasmatisches Malic Enzyme (ME 1).

6.3.2 Änderung des Phänotypus der humanen Tumoren unter Droloxifen-Therapie

Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente lassen erkennen, daß unter Droloxifen Behandlung bei 22 verschiedenen Isoenzymen keine qualitativen Veränderungen im menschlichen Phänotypus und auch keine quantitativen Veränderungen der Genexpression auftreten (siehe Abb. 12 und 13). Somit kann ein Überwuchern des menschlichen Gewebes mit Mausgewebe ausgeschlossen werden.

Beispielhaft wird hier die Expression folgender Isoenzyme dokumentiert, und zwar der Aspartat-Amino-Transferase (AST 1, AST 2; E.C.2.6.1.1) und der Lactat-Dehydrogenase (LDH A, LDH B; E.C.1.1.1.27).

Abb. 12: Isoenzymbanden der AST und LDH



Die Genprodukte vom Menschen sind durch ein * markiert, die übrigen Enzymaktivitäten stammen aus dem Gewebe der Nacktmaus.

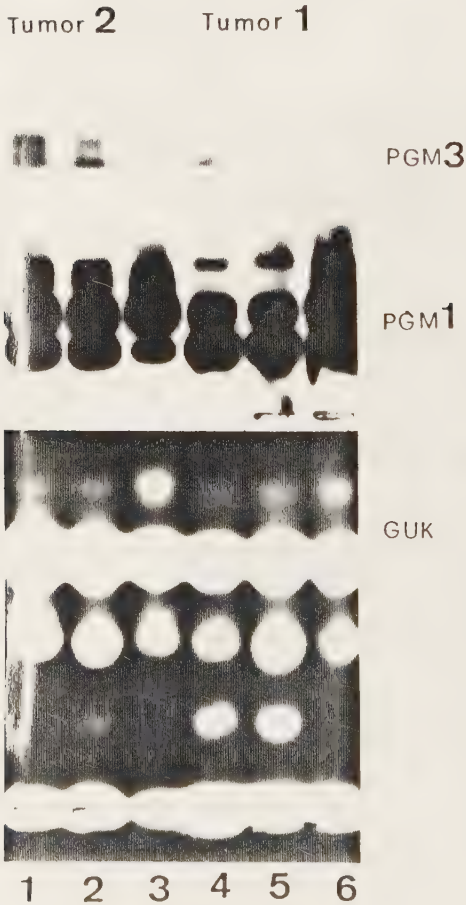
Tumor 2	1 Kontrolle
	2 nach Therapie
	3 vor Therapie
Tumor 1	4 Kontrolle
	5 nach Therapie
	6 vor Therapie

Die Isoenzymmuster der Tumorproben nach Therapie zeigen im Vergleich zu den Kontrollen keine qualitativen oder quantitativen Unterschiede in der Expression der Genprodukte.

Hier wird die Expression folgender Isoenzyme dokumentiert, und zwar der Phosphoglucomutase (PGM 1, PGM 3; E.C.2.7.5.1) und der Guanylat Kinase (GUK; E.C.2.7.4.8).

Abb. 13: Isoenzymbanden der PGM und GUK

Tumor 2	1 Kontrolle
	2 nach Therapie
	3 vor Therapie
Tumor 1	4 Kontrolle
	5 nach Therapie
	6 vor Therapie



Die Isoenzymmuster der Tumorproben nach Therapie zeigen im Vergleich zu den Kontrollen keine qualitativen oder quantitativen Unterschiede in der Expression der Genprodukte.

Bei den Guanylat-Kinasen tritt im Tumor 1 unter Therapie und in der Kontrolle eine zusätzliche, kathodische Isoenzymbande auf, die im Tumorgewebe vor Therapie fehlt.
Diese Isoenzymbande stammt möglicherweise von der Nacktmaus.

6.4 Immunozytochemische Färbung der Estrogenrezeptoren

Eine erfolgreiche Färbung der Estrogenrezeptoren ließ sich mit der unter 5.2.1.2 beschriebenen Gefrierschnittechnik durchführen. Die Abb. 14 und 15 demonstrieren anhand des unbehandelten estrogen- und progesteronrezeptorpositiven Tumors 3 die intranukleäre Lokalisation des bräunlich gefärbten Estrogenrezeptorproteins.

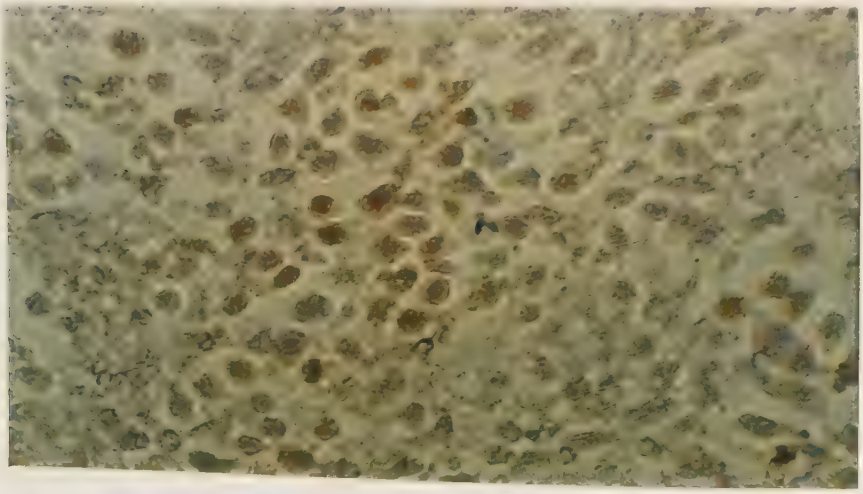


Abb. 14: Bräunlich gefärbter intranukleärer ER. Vergr. 400fach.

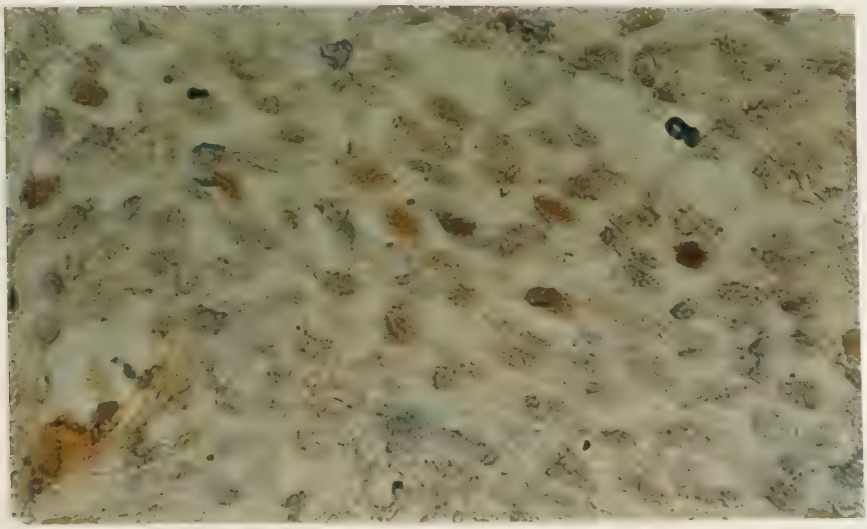


Abb. 15: Wie Abb. 14 "Nestartige" Lokalisation des ER.

IV. DISKUSSION

Mit der vorliegenden Arbeit wurden folgende Problemstellungen bearbeitet:

1. Wie verhält sich das Volumen von xenotransplantierten humanen Tumoren unter der Therapie mit Droloxifen - einem neuen Antiestrogen?

2. Wird die phänotypische Expression von Enzymen der Tumoren durch die Behandlung mit dem Antiestrogen beeinflußt?

3. Wie wirken sich unterschiedliche Nachweismethoden auf die Kinetik der Estrogen- und Progesteronrezeptoren im Verlauf der Therapieexperimente aus?

4. Ist die einfache immunozytochemische Estrogenrezeptorfärbemethode bei Paraffineinbettungstechnik vergleichbar mit der bereits etablierten Gefrierschnittmethode?

Den pharmakologischen Experimenten als Transplantationsempfänger diente das in vivo-Testmodell der thymusaplastischen Nacktmaus. Der Vorteil dieser in vivo-Testmethode liegt in der Erhaltung der primären Tumoreigenschaften der Xenotransplantate, dem Steroidhormonrezeptorgehalt und dem Isoenzymmuster. Somit nähert sich dieses Experimentalmodell den in vivo-Verhältnissen menschlicher Tumoren, wie verschiedene onkologische Studien gezeigt haben (Rygaard u. Poulsen 1969; Ueyama et al. 1977; Fitzgerald et al. 1978; Michel et al. 1980).

In den vergangenen drei Jahrzehnten wurden verschiedene Ansätze zur Festlegung von Auswahlkriterien für eine Hormontherapie in der Onkologie gemacht.
Als Beispiel ist hier die Überlegung anzuführen, daß der histologische Entdifferenzierungsgrad des Tumors einen Einfluß auf das Vorhandensein oder Fehlen von Estrogenrezeptorproteinen des Tumorgewebes haben könnte (Sachs u. Winzer 1976). Es zeigte sich jedoch, daß die prognostische Aussagekraft dieses Parameters hinsichtlich des Ansprechens einer endokrinen Therapie begrenzt war.

Anhand umfangreichen klinischen Zahlenmaterials, konnte der Zusammenhang zwischen der hormonellen Therapierbarkeit der Tumoren und dem Vorkommen von Steroidhormonrezeptorproteinen in Tumoren von hormonellen Zielorganen gezeigt werden (McGuire et al. 1975 c, Maass und Jonat 1979, Henningsen et al. 1980).

Bumma (1978) und Cavalli (1982) demonstrierten in ihren klinischen Studien ein Ansprechen der Therapie bei folgenden Steroidhormonrezeptorkonstellationen:

ER-/PR- < ER-/PR+ < ER+/PR- < ER+PR+

Patientinnen ohne bzw. mit geringen Mengen an Steroidhormonrezeptoren haben lediglich eine Remissionserwartung von 5,6 % (Maass und Jonat 1979).

McGuire und Horwitz (1978) fanden eine Abhängigkeit der Progesteronrezeptorsynthese vom Estradiol und der damit verbundenen Präsenz von Estrogenrezeptoren. Nach der Theorie von McGuire und Horwitz ist also die Präsenz von Progesteronrezeptoren an das Vorhandensein von Estrogenrezeptoren gebunden. Interessanterweise gibt es im Gegensatz dazu die Steroidhormonrezeptorkonstellation ER-/PR+ (Leclerq et al. 1977).

Die Untersuchung der Rezeptorabhängikeit des neuen Antiestrogens "Droloxifen", führte zu den Versuchen mit drei verschiedenen Tumoren mit unterschiedlichen Rezeptormustern:

a) einem Mammakarzinom (ER-/PR-)
b) einem Ovarialkarzinom (ER-/PR+)
c) einem Mammakarzinom (ER+/PR+)

In Übereinstimmung mit Shafle und Grantham (1981), die bei xenotransplantierten ER+/PR+ MCF-7 Brustkrebszellen unter Antiestrogentherapie (TAM) eine Wachstumshemmung beobachteten, zeigte das für die eigenen Experimente benutzte ER+/PR+ Mammakarzinom erwartungsgemäß gegen Ende des Experimentes ein deutlich verlangsamtes Wachstum in der Therapiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe.
Bei diesem Therapieversuch ist anzumerken, daß bei verlängerter Experimentdauer das Ergebnis vermutlich noch deutlicher ausgefallen wäre.

Die eigene Versuchsreihe mit dem ER-/PR+ Ovarialkarzinom erwies sich als äußerst interessant. Es konnte im Verlauf der Therapie eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums erzielt werden. Somit scheint bei völliger Abwesenheit des Estrogenrezeptors ein vorhandener Progesteronrezeptor durch Droloxifen beeinflußt werden zu können. Diese Beobachtung wird gestützt durch die Befunde von McGuire und Horwitz (1978), die zeigen konnten, daß die zusätzliche Bestimmung des Progesteronrezeptorgehaltes zum Estrogenrezeptorgehalt und deren positiver Befund die Vorhersagemöglichkeit einer objektiven Remission auf etwa 80 % erhöhen.
Ob es sich hier um eine Antiestrogenbindungsstelle handelt oder ob anderswo diese Bindungsstellen lokalisiert sind, ist Gegenstand weiterer Forschungsarbeit.

Ebenso konnte in dem selbst durchgeführten Therapieexperiment bei dem ER-/PR- Mammakarzinom keine signifikante Verzögerung des Tumorwachstums beobachtet werden. Es zeigte sich sogar eine deutlich stärkere Volumenzunahme der Tumoren der Therapiegruppe gegenüber denen der Kontrollgruppe.

Um den humanen Ursprung der Xenotransplantate nachzuweisen, werden in der Literatur verschiedene Enzyme zur Diagnostik als geeignet beschrieben. Zur Differenzierung von Mensch- und Mausgewebe eignen sich verschiedene Enzyme, wie die LDH, die Esterase-D, die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, die Phosphoglukomutase locus 1 und locus 2 und das Malic Enzym (Klein et al. 1974, Wright 1981, Slagel et al. 1982).
In der vorliegenden Arbeit wurden 22 verschiedene Isoenzyme zur Diagnostik benutzt (siehe Tab. 11).
Es zeigten sich weder qualitative Abweichungen des menschlichen Phänotypus, noch quantitative Veränderungen der Genexpression. Dies ist insofern wichtig, als es sich bei dem Nacktmausmodell um ein in vivo-Testmodell handelt. Das humane Gewebe muß daher reidentifizierbar sein, um ein Überwachsen mit Mausgewebe auszuschließen (Kömpf et al. 1984). Das menschliche Gewebe war unbeeinflußt durch die Transplantation in die Nacktmaus und der Behandlung mit Droloxifen.

Der Nachweis der Estrogenrezeptor- und Progesteronrezeptorproteine ist in der vorliegenden Arbeit, auf zwei verschiedenen Prinzipien basierend, durchgeführt worden.
Die eine Möglichkeit quantifiziert lediglich zum Zeitpunkt der Durchführung des Tests unbesetzte Rezeptorstellen (DCC; siehe auch II. 1.2.3).
Der zweite immunologische Test weist alle Estrogenrezeptorproteine nach, gleichgültig ob sie z.B. durch Antiestrogene besetzt sind oder nicht (EIA; siehe auch II. 1.2.1).

Horwitz und McGuire (1980) beobachteten bei an MCF-7 (ER+, PR+) Mammatumorzellen durchgeführten Untersuchungen bei Antiestrogentherapie (TAM) eine Anhebung des Progesteronrezeptorgehaltes. Dies wurde auch von Michel (1982) bei Mammatumoren, die auf Nacktmäuse xenotransplantiert waren, beschrieben. Jordan et al. (1979) konnten über ähnliche Erfahrungen an Ratten berichten. TAM-Behandlungen an fetalen und neugeborenen Meerschweinchen-Vaginae bedingten ebenfalls eine Anhebung des Progesteron-Rezeptorgehaltes (Nguyen et al. 1986).
Abweichend von diesen Befunden zeigten Nicholsen et al. (1979) und Koenders et al. (1980) nur eine initiale Anhebung des Progesteronsrezeptorgehaltes mit darauffolgendem Abfall.

Weder die Stimulierung des Progesteronrezeptorgehaltes, noch die initiale Anhebung konnten in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden (siehe III. 6.2). Diese Tatsachen dokumentieren die auch in der Literatur (Löser et al. 1986) bereits beschriebenen, signifikant verminderten intrinsischen estrogenen Nebenwirkungen von Droloxifen gegenüber TAM.

In der vorliegenden Arbeit wurden Progesteronrezeptorproteine mit dem DCC-Test, also mit radioaktiv markiertem Steroidhormon, nachgewiesen. An diesen Ergebnissen ist kritisch anzumerken, daß die benützte Testmethode nur die unbesetzten PR-Stellen nachgewiesen hat. Es besteht durchaus die Möglichkeit, daß bereits besetzte PR durch endokrine Regulationsmechanismen im Zusammenhang mit Estrogenen frei wurden und somit nachweisbar sind. Seit kurzer Zeit ist ein Progesteronrezeptortest im Handel, der wie der EIA alle Steroidhormonrezeptorproteine nachweist. Künftige Forschungen werden den neuen PR-EIA mit der alten Methode der radioaktiv markierten Steroide vergleichen müssen.

Verschiedene Autoren beschrieben eine Abnahme des Gehaltes an Estrogenrezeptorproteinen während einer Antiestrogentherapie (Koenders et al. 1980, Horwitz, McGuire 1980 und Michel 1982). Diese Befunde sind äußerst kritisch zu beurteilen, da diese Autoren alle den DCC-Test benutzten, der nur unbesetzte Rezeptorproteine anzeigt. Durch die antiestrogene Therapie werden die Rezeptoren besetzt, so daß diese mit dem herkömmlichen Verfahren nicht mehr nachweisbar sind. Dies ist insbesondere in der klinischen Situation bedeutend, als man die lange Halbwertszeit von Tamoxifen berücksichtigen muß (Koseki et al. 1977).
Bei den selbst durchgeführten Experimenten lag der Estrogenrezeptorgehalt (siehe III. 6.2) am Ende der Therapie tatsächlich um 50 % höher als dies der DCC-Test anzeigte. Die Kontrollen dagegen weisen identische Gehalte auf. Ebensowenig konnte eine Stimulation der gleichzeitig vorhandenen Progesteronrezeptoren gezeigt werden.

Der immunzytochemische Nachweis von ER-Proteinen erfolgte bisher relativ zeit- und arbeitsaufwendig mit einem Gefrierschnittverfahren (siehe III. 5.2.1.2). Diese Technik sollte durch eine im Routinelabor schneller und einfacher durchführbare Paraffineinbettungstechnik (siehe III. 5.2.1.1) ersetzt werden.

In der Literatur wurden diese beiden Verfahren diskutiert und von verschiedenen Autoren als adequat akzeptiert (Poulsen et al. 1984, Shimada et al. 1985, Greene und Press 1986).

Die Paraffineinbettungstechnik wurde bei den eigenen Experimenten mehrfach durchgeführt und führte auch bei akribischer Einhaltung der Verfahrensvorschrift nie zum gewünschten Erfolg. Als Grund für diesen Befund könnte vor allem die Fixationstechnik verantwortlich sein.

Remmele (1986) konnte in seinen Untersuchungen auch kein befriedigendes und vor allem qualitativ mit dem Gefrierschnitt vergleichbares Paraffintechnikergebnis dokumentieren.

Es wurden Estrogenrezeptorproteine bei Anwendung der Gefrierschnittechnik und Färbung mit dem ERICA (Estrogen Receptor Immuno Cytochemical Assay) beobachtet (siehe III. 6.4). Dazu wurde der Tumor 3 (ER+, PR+) verwendet, der sich zwar ER-positiv präsentiert, aber als estrogenrzeptorarm einzustufen ist (siehe III. 6.2.). So erklärt sich auch das histologische Bild bei dem vereinzelt nukleäre ER zu beobachten sind, abwechselnd mit umschriebenen "nestartigen" Bezirken mit deutlich mehr gefärbten ER.

Auffällig viele Patientinnen werden ER-negativ eingestuft und somit nicht zu einer die Patientin weniger belastenden antiestrogenen Therapieform ausgewählt. Diese Falschbefundung liegt in erster Linie an der Nichtausschöpfung der diagnostischen Möglichkeiten bzw. einer falschen Interpretation, die z.B. bei einer Vorbehandlung mit Antiestrogenen eintreten kann. Im Falle des Tumor 3, bei dem der ERICA eine nestartige Färbung von ER zeigt, hätten unter Umständen der DCC sowie der EIA ER nicht nachweisen können. Diese beiden Verfahren wären dann vielleicht nicht mehr empfindlich genug gewesen.
Eine weitere diagnostische Problematik wirft der DCC im Vergleich zum EIA auf. ER, die durch körpereigenes Estrogen besetzt sind, können durch den EIA, nicht aber durch den DCC erkannt werden, weil die DCC-Bindungsstelle besetzt ist. Daher sollten hormonabhängige Tumoren mit dem EIA in Kombination mit dem ERICA beurteilt werden, um den Rezeptornachweis so empfindlich zu gestalten, wie es momentan technisch möglich ist.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit mit dem Antiestrogen Droloxifen sind folgende Fragestellungen mit Hilfe des Nacktmausmodells untersucht worden:

1.) Wie wirkt Droloxifen, ein neues Antiestrogen, auf das Wachstum von humanen xenotransplantierten Tumoren?

Es kam zu keiner Regression des Tumorwachstums bei einem ER-/PR- Mammakarzinom, zu einer signifikanten Regression des Tumorwachstums unter Therapie bei einem ER-/PR+ Ovarialkarzinom und zu einer terminalen signifikanten Regression des Tumorwachstums bei einem ER+/PR+ Mammakarzinom.

2.) Wie verhält sich die Kinetik der Estrogen- und Progesteronrezeptoren unter der Therapie mit Droloxifen?

Bei dem ER-/PR- Tumor kam es zu keinem Zeitpunkt zu einer Expression von Rezeptoren.
Bei dem ER-/PR+ Tumor nahm der Progesteronrezeptorgehalt im Verlauf der Therapie konstant ab.
Beim ER+/PR+ Tumor fiel der Gehalt der Estrogenrezeptoren beim Nachweisverfahren mit dem DCC-Test stetig ab. Beim Nachweis mit EIA steigt der ER-Gehalt an und liegt am Ende des Experiments noch um 50 % höher als beim DCC-Test.
Die Progesteronrezeptoren sind nachweisbar, ihr Gehalt fällt jedoch im Verlauf des Experimentes ab.

3.) Wird die phänotypische Enzymexpression des menschlichen Xenotransplantates durch Droloxifen oder Nacktmausgewebe beeinflußt?

Die Analyse der Zymogramme zeigte keine Einflußnahme auf die Enzymexpression des Humangewebes.

Die Ergebnisse dokumentieren die Wirksamkeit von Droloxifen, die jedoch vom Rezeptorstatus des Gewebes abhängig ist. Die Arbeit liefert ebenfalls den Beleg für eine geringere intrinsische Estrogenität der Substanz, da der Progesteronrezeptor in den Experimenten nicht induziert werden konnte.

VI. SUMMARY

Droloxifene - a novel antiestrogen in the therapy of human tumors in athymic mice

In the present study with the antiestrogen droloxifene the following questions were considered using the nude mouse model.

1.) How does droloxifene, a novel antiestrogene, effect the growth of human xenotransplanted tumors?

There was no noticeable regression of the tumor growth in a ER-/PR- mammary carcinoma.
Significant regression of the tumors growth was observed during the course of therapy by a ER-/PR+ ovarian carcinoma.
Significant regression of the tumors growth was demonstrated at the end of the treatment using a ER+/PR+ mammary carcinoma.

2.) Are estrogen- and progesterone receptors affected during therapy with droloxifene?

No expression of receptors was evident in the ER-/PR- tumor.
Using the ER-/PR+ tumor the contents of progesterone receptors steadily decreased during therapy.
Using the DCC-test there is evidence that the estrogen receptors of an ER+/PR+ tumor decreased.
In contrast with an EIA an increase of estrogen receptor contents could be demonstrated. Final results proved a 50 % higher content in comparison to the DCC-test.
Progesterone receptors constantly decrease during the experiment.

3.) Is there an effect on the phenotypic expression of enzymes of the human xenotransplants by droloxifene or by the host (nude mouse)?

Analysis of the zymograms showed no influence on the human enzyme expression.

The results document the effectiveness of droloxifene, however, his dependence on the receptor quantity of the tissue.
The experiments also prove a reduced intrinsic status of estrogenity of the substance, because the progesterone receptor could not be induced.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

AITKEN S.C., M.E. Lippmann: Hormonal synchronization of net DNA synthesis in human breast cancer cells in tissue culture. In: Jimenez de Asua L., R. Levi-Montalcini, R. Shields, S. Jacobelli (eds.): Control mechanisms in animal cells. Raven Press, N.Y. 156 (1980).

ALEXANDER R.B., G.L. Greene and E.R. Barrack: Estrogen receptors in the liver nuclear matrix: direct demonstration using monoclonal anti-receptor antibody. Endocrinol 119, 83 (1986).

BASTERT G.: Heterotransplantation menschlicher Tumoren, vorzugsweise Mammakarzinome, auf thymusaplastische nu/nu-Mäuse. Ein wissenschaftliches und klinisches Testmodell. Habilitationsschrift, Fachbereich Humanmedizin der J.W. Goethe Universität, Frankfurt am Main (1976).

BASTERT G., H.P. Fortmeyer, H. Eichholz, R.Th. Michel, R. Huck, H. Schmidt-Matthiesen: Human breast cancer in thymusaplastic nude mice. In: G. Bastert, H.P. Fortmeyer, H. Schmidt-Matthiesen (Hrsg.): Thymus aplastic nude mice and rats in clinical oncology. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 182 (1981).

BEATSON G.T.: On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma. Suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. Lancet II, 107 (1896).

BULBROOK R.D., J.L. Hayward: Abnormal urinary steroid excretion and subsequent breast cancer. Lancet I, 519 (1967).

BUMMA C.: Korrelation zwischen Behandlungsergebnis und Vorhandensein von Hormonrezeptoren bei Patientinnen, die mit MPA in hohen Dosen behandelt wurden. Referat anläßlich der "Riunioni integrate di Oncologia", Florenz, 15.-16.6.1978. In: Mammakarzinom, Informationsschrift der Farmitalia Carlo Erba GmbH (1981).

CAVALLI F., A. Goldhirsch, F. Jung, G. Martz, P. Alberto: Vergleich von niedrig- und hochdosiertem Medroxyprogesteronacetat in der Behandlung des fortgeschrittenen Brustkrebses. Med. Klin. Sondernummer 2, 22 (1982).

CHAN L., B.W. O'Malley: Mechanism of action of the sex steroid hormones. N Engl J Med 294, 1322, 1372, 1430 (1976).

COLE M.P., C.T.A. Jones, J.D.H. Todd: A new antiestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI 46, 474. Br J Cancer 25, 270 (1971).

COLE M.P., C.T.A. Jones, J.D.H. Todd: The treatment of advanced carcinoma of the breast with the antioestrogenic agent tamoxifen. (ICI 46, 474) - A series of 96 patients. Advances in antimicrobial and antineoplastic chemotherapy 2, 529 (1972).

COLZY E., J.L. Borgna and H. Rochefort: Tamoxifen and metabolites in MCF-7 cells: Correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. Cancer Res 42, 323 (1982).

COWAN K., M.E. Goldsmith and R.M. Levine: Dihydrofolate reductase gene amplification and rearrangement in methotrexateresistant human breast cancer cells: response to estrogen. J Biol Chem 257, 15086 (1982).

DE SOMBRE E.R., S. Mohla, E.V. Jensen,: Receptor transformation, the key to estrogen action, J Steroid Biochem 6, 473 (1975).

DI MARCO A.: The antitumor activity of 6-alpha-methyl-17-alpha-acetoxy Progesterone (MPA) in experimental mammary cancer. In: S. Jacobelli, A. Di Marco(eds.): Role of medroxyprogesterone in endocrine-related tumours. Progr Cancer Research Ther 15, 1 (1980).

EDIGER R., B.C. Giovanella: Current knowledge of breeding and mass production of the nude mouse. In: J. Fogh, B.C. Giovanella (eds.): The nude mouse in experimental and clinical research, Academic Press, New York, San Francisco, London (1978).

EDWARD D.P., S.R. Marthy and W.L. McGuire: Effects of estrogen and antioestrogen on DNA polymerase in human breast cancer. Cancer Res 40, 1726 (1980).

EMMENS C.W. and L. Martin: Oestrogenic, anti-oestrogenic and antifertility, activities of various compounds, J Reprod Fertil 9, 283 (1965).

FEHERTY P., G. Farrer-Brown and A.E. Kellie: Oestradiol receptors in carcinoma and benign disease of the breast: An in vitro assay, Br J Cancer 25, 710 (1971).

FEX G., G. Adielsson and W. Mattson: Oestrogen-like effects of tamoxifen on the concentration of proteins in plasma. Act Endocrinol 97, 113 (1981).

FIEBIG H.H.: Wachstum und Chemotherapie menschlicher Tumoren - vorwiegend Dickdarm-, Magen- und Bronchialkarzinome in der thymusaplastischen Nacktmaus. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg (1983).

FITZGERALD P.J., E. Sharkey, J. Fogh, F. Varrichino, A. Cubilla, P. Pour: The nude mouse as a tissue amplifier for studies of experimental and human pancreas cancer. In: J. Fogh, B.C. Giovanella (eds.). The nude mouse in experimental and clinical research. Academic Press, New York, San Francisco, London, 279 (1978).

FLANAGAN S.P.: "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. Genet Res Camb 8, 295 (1966).

FORTMEYER H.P.: Das standardisierte Versuchstier und seine Umwelt. Symp. über Versuchstierhaltung, Barcelona, 30.5.1979, Symposiumband von der Firma Altromin International Tierlabor-Service überreicht (1979).

FORTMEYER H.P.: Thymusaplastische Maus (nu/nu), Ratte (rnu / rnu). Haltung, Zucht, Versuchsmodelle. Paul Parey Verlag (1981).

GASC J.M., J. Renoir, C. Radanyi, J. Joab, P. Tuohimaa and E.E. Baulieu: Progesterone receptor in the chick oviduct: an immunohistochemical study with antibodies to distinct receptor components. J Cell Biol 99, 1201 (1984).

GERSHWIN M.E., J.J. Castles: T-cell differentiation and autoimmune phenomena in congenitally athymic (nude) new zealand mice. In: N.D. Reed (ed.): Proc. Third Int. Workshop Nude Mice. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 270 (1981).

GREEN M.C.: Genetic variants and strains of the laboratory mouse, G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 175, 281 (1981).

GREENE L.G. and M.F. Press: Structure and dynamics of the estrogen receptor, J Steroid Biochem 24, 7 (1986).

HARTMANN W.H., L. Ozello, LH. Sobin, H. Stalsberg: Histological typing of breast tumours, Second Edition, WHO, Geneva (1978).

HENNINGSEN B. and H. Amberger: Antiestrogene Therapie des Metastasierenden Mammakarzinoms, Dtsch Med Wschr, 102, 713 (1977).

HENNINGSEN B., F. Linder, C. Steichele: Endocrine treatment of breast cancer. A new approach. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1980).

HOLDEN H.T., R.B. Herberman, A. Santoni, M.E. Nunu: Natural cell mediated cytotoxicity in nude mice. In: D.P. Houchens, A.A. Ovejera (eds.), Proc. Symposium on the use of athymic (nude) mice in cancer research, Fischer Verlag, New York, Stuttgart (1978).

HORWITZ K.B., W.L. McGuire, O.H. Pearson, A. Segaloff: Predicting response to endocrine, therapy in human breast cancer: A hypothesis. Science 189, 726 (1975).

HORWITZ K.G., W.L. McGuire: Estrogen and progesterone: Their relationship in hormone dependent breast cancer: In: McGuiere W.L., J.P. Raynaud, E.E. Baulieu (eds.): Progesterone receptors in normal and neoplastic tissues. Raven Press, New York (1977).

HORWITZ K.B., W.L. McGuire: Studies on mechanism of estrogen and antiestrogen action in human breast cancer. In: B. Henningsen, F. Linder, C. Steichele (eds.): Endocrine treatment of breast cancer, A new approach. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 45 (1980).

HUBER H.J., F. Stanislaus: Pharmacokinetic and metabolism of 3-hydroxytamoxifencitrate in laboratory animals. J Cancer Res Clin Oncol 109, 142 (1985).

HUBER H.J., P. Jank, Ch. Moser, G. Schnarrenberger, H.J. Staab, F. Stanislaus: Pharmacokinetic profile of the novel antiestrogen droloxifene in postmenopausal patients with advanced breast cancer. Proc./3rd Eur. Conf. Biopharm. Pharmacol, Freiburg F.R.G. (1987).

HUSEBY R.A., T.M. Maloney, C.M. McGrath: Evidence for direct growth-stimulating effect of estradiol on human MCF-7 cells in vivo. Cancer Res 44, 2659 (1984).

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY: Nomenclature Committee, Enzyme Nomenclature. Academic Press, New York (1978).

JANNE O., K. Kontula, R. Vihko: Mechanism of action of female sex steroids. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl 51, 29 (1975).

JENSEN E.V., H.I. Jacobson: Recent progress in hormone research. In: (Pincus, G ed.): Basic guides to the mechanism of estrogen-receptor action, Academic Press, N.Y., 18, 408 (1962).

JENSEN E.V., E.R. De Sombre and P.W. Jungblut. In: Endogenous factors influencing host-tumour balance.
L.R.W. Wissler, T.L. Dao and S. Wood (eds.),30 (1967). University of Chicago Press, Chicago (1967).

JORDAN V.C., C.J. Dix, G. Prestwich: Inhibition of cell division and stimulation of progesterone receptor synthesis in rat oestrogen target tissues by non-steroidal antioestrogens. Adv Exp Med Bio, Leavitt and Clark (eds.), 577, 13 (1979).

JORDAN V.C.: Biochemical pharmacology of antiestrogen action. Pharmacol Rev 36, 245 (1984).

JUNGBLUT P.W., W.J. Ganes, A. Hughes, E. Kallweit, W. Sierralta, P. Szendra, R.K. Wagner: Activation of transcription-regulating proteins by steroids. J Steroid Biochem 7, 1109 (1976).

KASID A., M.E. Lippmann: Regulation of thymidine kinase mRNA in human breast cancer cells. J Biol Chem 261, 5567 (1986).

KATZENELLENBOGEN B.S. and E.R. Ferguson: Antiestrogen action in the uterus: Biological ineffectivenes of nuclear bound estradiol after antiestrogen. Endocrinol 97, 12 (1975).

KINDRED B.: Nude mice in immunology. Prog Allerg 26, 137 (1979).

KING W.J., E.R. De Sombre, E.V. Jensen, G.L. Greene: Comparison of immunocytochemical and steroid-binding assays for estrogen receptor in human breast tumors. Cancer Res 45, 304 (1985).

KLEIN G., B.C. Giovanella, T. Lindahl, P.J. Fialkow, S. Singh, J.S. Stehlin: Direct evidence for the presence of Eppstein-Barr virus DNA and unclear antigen in malignant epitheloid cells with poorly differentiated carcinoma of the nasopharynx. Proc Natl Acad Sci 71, 4741 (1974).

KÖMPF J., H.J. Staab, H. Heilbronner, F.A. Anderer, H. Ritter: Cell fusion responsible for horizontal oncogenesis by human tumors in nude mice, BBRC 124, 938 (1984).

KOENDERS A.J.M., L.V.M. Beex, J. Geurts-Moespot, Th.J. Benraad: Steroid hormone receptors in mammary carcinoma: the effect of tamoxifen. In: H.T. Mouridsen, T. Palshof (eds.): Breast cancer, experimental and clinical aspects. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, 63 (1980).

KOLB R., R. Jakesz, H. Reiner: Results with tamoxifen in advanced mamary carcinoma. In: B. Henningsen, F. Lindey, C. Steichele (eds.): Endocrine treatment of breast cancer. A new approach. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1980).

KORENMAN S.G., B.A. Dukes: Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 30, 639 (1970).

KOSEKI Y., D.T. Zava, G.C. Chamness and W.L. McGuire: Estrogen receptor translocation and replenishment by the antiestrogen tamoxifen, Endocrinol 101, 1104 (1977).

LECLERQ G., N. Hulin and J.C. Heuson: Interaction of activated estradiol-receptor complex and chromatin in isolated uterine nuclei. Eur J Cancer 9, 685 (1973).

LECLERQ G., J.C. Heuson, M.C. Deboel, N. Legros, E. Longeval, W.H. Mattheiem: Estrogen and progesterone receptors in human breast cancer. In: McGuire W.L., J.P. Raynaud, E.E. Baulieu (eds.): Progesterone receptors in normal and neoplastic tissues. Raven press, New York (1977).

LECLERQ G., J.C. Heuson: Physiological and pharmacological effects of estrogens in breast cancer. Biochem Biophys Acta 560, 427 (1979).

LERNER L.J., F.J. Holthaus and C.R. Thompson: A non steroidal estrogen antagonist 1-(p-2-Diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenyl Ethanol. Endocrinol 63, 318 (1958).

LIPPMANN M., G. Bolan, K. Huff: The effects of estrogens and antiestrogens on hormone responsive human breast cancer in long-term tissue culture. Cancer Res 36, 4601 (1976a).

LIPPMANN M., G. Bolan, K. Huff: Interactions of antioestrogens with human breast cancer in long term tissue culture. Cancer Treat Rep 60, 1430 (1976b).

LIPPMANN M.E., S.C. Aitken, J.C. Allegra: Regulation of growth and DNA synthesis by estrogens and antiestrogens in human breast cancer cell lines. In: Sutherland R.L., V.C. Jordan (eds.): Nonsteroidal antiestrogens. Molecular pharmacology and antitumor activity. Academic Press, Sydney 496, 396 (1981).

LIPPMANN M.E.: Endocrine responsive cancers of man. In: Williams R.H. (ed.): Textbook of Endocrinology. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1326 (1985).

LIPPMANN M.E., S. Bates, K. Huff, N. Davidson, R.B. Dickson: Estrogens regulate production of specific growth factors in hormone dependent human breast cancer. J Lab Clin Med 109, 235 (1987).

LÖSER R., K. Seibel, H.D. Liehn, H.-J. Staab: Pharmacology and toxicology of the antiestrogen droloxifene. Contr Oncol 23, 72 (1986).

LOWRY O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein-measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193, 265 (1951).

MAASS H., W. Jonat: Steroidrezeptoren in Mammakarzinomen. Bericht über ein Consensus-Meeting im National Institute of Health, Bethesda, USA. Geburtsh u. Frauenheilk 39, 761 (1979). In: McGuire W.L., P.P. Carbone, M.E. Sears, G.C. Escher, E.P. Vollmer (eds.): Estrogenreceptors in human breast cancer: An over view Raven Press, New York (1975c).

MCGUIRE W.L., J.P. Raynaud, E.E. Baulieu: Progesterone receptors in normal and neoplastic tissues. In: McGuire W.L.: Hormones, receptors and breast cancer. Raven Press, New York (1978).

MCGUIRE W.L., K.B. Horwitz: Progesterone receptors in breast cancer. In: W.L. McGuire (eds.).: Hormones, receptors and breast cancer. Raven Press, New York (1978).

MCPHERSON C.W.: Reduction of pseudomonas aeruginosa and coliform bacteria in mouse drinking water following treatment with hydrochloric acid or chlorine. Lab Anim Car 13, 737 (1963).

MEAKIN J.W.: Proceedings of symposium "a new approach to endocrine treatment of breast cancer". Ann Int Medicine 89, 721 (1978).

MESTER I., D. Martel, A. Psychoyos, E.E. Baulieu: Hormonal control of oestrogen receptor in uterus and receptivity for ovoimplantation in the rat. Nature 250, 776 (1974).

MICHEL R.Th., H. Schmidt-Matthiesen, G. Bastert, H.P. Fortmeyer-Human breast cancer in nude mice. A model for testing endocrine treatment. In: B. Henningsen, F. Linder, C. Steichele (eds.): Endocrine treatment of breast cancer. A new approach. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 59 (1980).

MICHEL R.Th., G. Bastert, H.P. Fortmeyer, M. Stegmüller, H. Schmidt-Matthiesen: Der onkostatische Effekt verschiedener hormoneller und zytostatischer Behandlungsformen. Eine Untersuchung anhand von Serientransplantationen menschlicher Mammakarzinome auf nu/nu Mäuse. In: W. Jonat, H. Maas (Hrsg.): Steroidhormonrezeptoren im Karzinomgewebe. Methodische und klinische Aspekte von Steroidhormonrezeptoren unter Berücksichtigung des Mammakarzinoms. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 198 (1982).

MOURIDSEN H., T. Palshof, J. Patterson and L. Battersby: Tamoxifen in advanced breast cancer. Cancer Treat Rev 5, 131 (1978).

NGUYEN B.L., N. Giambiagi, C. Mayrand, F. Lecerf und J.R. Pasqualini: Estrogen and progesterone receptors in the fetal and newborn vagina of guinea pig: biological, morphological, and ultrastructural responses to tamoxifen and estradiol. Endocrinol 119, 3 (1986).

NICHOLSON R.I., M.P. Golder, P. Davies, K. Griffiths: Effects of estradiol-17-beta and tamoxifen on total and accessible cytoplasmic estradiol-17-beta receptors in DMBA-induced rat mammary tumors. Eur J Cancer 12, 711 (1976).

NICHOLSON R.I., P. Daniel, S.J. Gaskell, J.S. Syne, P. Davies, K. Griffiths: The biochemisty of tamoxifen therapy of breast cancer. In: M.K. Agarwel (ed) Antihormones. Biomed Press, 253 (1979).

OHSAWA N., Y. Ueyama, K. Morita, Y. Kondo: Heterotransplantation of human functioning tumors to nude mice. Proc. of the Sec. Int. Workshop on Nude Mice, University of Tokyo Press, Tokyo 1977. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1977).

OSBORNE C.K., D.H. Boldt, G.M. Clark, J.M. Trent: Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G 1 phase. Cancer Res 43, 3583 (1983).

OSBORNE C.K., K. Hobbs, G.M. Clark: Effects of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. Cancer Res 45, 584 (1985).

PANTELOURIS E.M., J. Hair: Thymus dysgenesis in nude (nu/nu) mice. J Embryol Exp Morph 24, 615 (1970).

PATTERSON J.S.: "Nolvadex" (tamoxifen) as an anticancer agent in humans. In: Non steroidal antiestrogens, R.L. Sutherland and V.C. Jordan (eds.), Academic Press, Sydney, 472 (1981).

PERROT-APPLANAT M., F. Logeat, M.T. Groyer-Pickard and E. Milgrom: Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. Endocrinol 116, 1484 (1985).

PERRY M: Evaluation of breast tumor sex chromatin as an index for survival and response to pituiatary ablation. Br J Surg 59, 371 (1971).

POULSEN H.S., L. Ozzello, W.J. King and G.L. Green: The use of monoclonal antibodies to estrogen receptors (ER) for immunoperoxidase detection of ER in paraffin sections of human breast cancer tissue. J Histochem Cytochem 33, 92 (1984).

PRIESTMAN T., M. Baum, V. Jones and J. Forbes: Comparative trial of endocrine versus cytotoxic treatment in advanced breast cancer. Br Med J 1, 1248 (1977).

REMMELE W.: Mammakarzinom: Prognistisch wichtige Rezeptorbestimmungen. Dtsch Ärztebl 83, 3360 (1986).

ROBERTS S., C.M. Szego: Steroid interaction in the metabolism of reproductive target organs. Physiol Rev 33, 629 (1953).

ROSE C., S.M. Thorpe, J. Lober, J.L. Daenfeldt, T. Palshof, H.T. Mouridsen: Therapeutic effect of tamoxifen related to estrogen receptor level. In: B. Henningsen, F. Linder, C. Steichele (eds.): Endocrine treatment of breast cancer, A new approach. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1980).

ROSS G.T., R.L. Vande Wiele, A.G. Frantz: The ovaries and the breasts. In: Williams R.H. (ed.): Textbook of Endocrinology. W.B. Saunders Co., Philadelphia 411 (1981).

RYGAARD J., C.O. Poulsen: Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. Acta Pathol Microbiol Scand 77, 758 (1969).

SACHS H., J. Winzer: Histologischer Tumortyp, DNS-Gehalt und Chromatinstruktur der Mammakarzinome mit positivem und negativem 17-B-Östradiol-Rezeptor-Nachweis. Arch Gynäk 221, 323 (1976).

SATO V.L., Waksal D.S., A.L. Herzenberg: Identification and separation of pre T-cells from nu/nu mice. Differentiation by preculture with thymic reticuloepithelial cells. Cell Immunol 24, 173 (1976).

SCATCHARD G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann NY Acad Sci 51, 660 (1949).

SERVO S.F., R.E. Scully, L.H. Sobin: Histological typing of ovarian tumours, WHO, Geneva (1973).

SHAFLE S.M., F.H. Grantham: Role of hormones in the growth and regression of human breast cancer cells (MCF7) transplanted into athymic nude mice. JNCl 67, 51 (1981).

SHARKEY F.E., J. Fogh: Considerations in the use of nude mice for cancer research. Cancer Metast Rev 3, 360 (1984).

SHIMADA A., K. Satoshi , A. Kaoru, N. Koichi, A. Isamu, Y. Ken, S. Masatumi, N. Takashi, and L.S. Miller: Immunocytochemical staining of estrogen receptor in paraffin sections of human breast cancer by use of monoclonal antibody: Comparison with that in frozen sections. Proc Natl Acad Sci 82, 4807 (1985).

SLAGEL D.E., W.B. Berins, J.J. Beasley: Phenotypic character of serially heterotransplanted tumors in athymic mice. In: N.D. Reed (eds.): Proc. Third Intern. Workshop Nude Mice. G. Fischer Verlag, New York, Stuttgart, 278 (1974).

SUTHERLAND R.L. and M.S. Foo: Differential binding of anti-estrogens by rat uterine and chick oviduct cytosol. Biochem Biophys Res Comman 91, 191 (1979).

SUTHERLAND R.L. and C.L. Murphy: Mechanism of oestrogen antagonism by nonsteroidal antioestrogens. Molec Cell Endocrinol 25, 23 (1981).

SUTHERLAND R.L., R.E. Hall, I.W. Taylor: Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau phase cells. Cancer Res 43, 3998 (1983).

STAAB H.J. and F.A. Anderer: Growth of human colonic adenocarcinoma and development of serum CEA in athymic mice. In: Strict correlation of tumor size and mass with serum CEA concentration during logarithmic growth. Br J Cancer 46 841 (1982).

STAAB H.J., H. Heilbronner, M. Schrader, F.A. Anderer: In vivo induction of neoplastic growth in nude mouse connective tissue adjacent to xenografted human tumors. J Cancer Res Clin Oncol 105, 35 (1983).

STAAB H.J., F.A. Anderer: Antisera against circulating human tumor associated antigens. Proc. 31 st annual colloguium of the protides of the biological fluids. Pergamon Press, Oxford, New York 516 (1984).

STEWART H.J.: Study on "nolvadex" (tamoxifen) against oestrogens. Rev Endocr Rel Cancer Suppl. 3, (1979).

TAMAOKI N., S. Habu, T. Suto, A. Akatsuka, K. Okumura, M. Kasai, M. Saito: Characterization and strain difference of natural killer cells in nude mice. In: N.D. Reed (eds.): Proc. third intern workshop nude mice. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York 422 (1982).

TERENIUS L: Two modes of interaction between oestrogen and anti-oestrogen. Acta Endocrinol 64, 58 (1970).

TERENIUS L: Structure activity reactionships of antioestrogens with regard to interaction with 17-beta-oestradiol in the mouse uterus and vagina. Acta Endocrinol 66, 447 (1971).

THUNERT A., W. Heine: Zur Trinkwasserversorgung von SPF-Tieranlagen. III Erhitzung und Ansäuerung von Trinkwasser. Zschr Versuchstier 17, 50 (1975).

UEYAMA Y., K.S. Morita, M. Koyama, Y. Kondo, N. Tamaoki, N. Ohsawa, T. Nomura: Establishment and maintenance of human malignant tumors serially transplanted to nude mice. Proc. sec. int. workshop on nude mice, University of Tokyo, 1977, G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1977).

WELSHONS W.V., M.E. Lieberman and J. Gorski: Nuclear localization of unoccupied oestrogen recptors. Nature 307, 749 (1984).

WENSE G: Ergebnisse der Radiohypophysektomie beim metastasierenden Mammakarzinom unter Berücksichtigung des Geschlechtschromatin. Langenbecks Arch Klin Chir 323, 339 (1969).

WRIGHT W.C., W.P. Daniels, J. Fogh: Distinction of seventy one cultured human tumor cell lines by polymorphic enzyme analysis. J Nat Cancer Inst 66, 247 (1981).

VIII. ANHANG

1. ORIGINALMESSDATEN ZUM TUMOREXPERIMENT 1 (Tumor 1)
Volumenangabe in ccm

Tag 0		Tag 17		Tag 27		Tag 37	
T	K	T	K	T	K	T	K
0,13	0,11	0,63	0,27	2,24	1,24	3,73	3,90
0,23	0,07	0,73	0,42	0,89	1,85	3,63	2,72
0,09	0,18	0,42	0,27	1,06	1,13	4,35	2,55
0,11	0,13	0,47	0,52	0,82	1,33	2,12	2,72
0,13	0,13	0,42		1,77		1,77	
0,13	0,38	0,58		1,21		4,82	
0,15	0,07	0,04		1,77			
0,15	0,21	0,82		3,39			
0,21		0,42					
0,09		0,03		1,21			
0,03		0,58					
0,18		0,23					
0,21		0,68					
0,18		0,07					
0,13		0,47					
0,34		0,52					
0,15		0,03					
0,18		0,42					
0,18		0,51					
0,07		0,51					
0,13		0,23					
0,17							
0,17							
0,15							
0,27							

Tag = Messtag

T = Therapiekollektiv

K = Kontrollkollektiv

2. ORIGINALMESSDATEN ZUM TUMOREXPERIMENT 2 (Tumor 2)
Volumenangabe in ccm

Tag 0		Tag 17		Tag 25		Tag 29	
T	K	T	K	T	K	T	K
0,06	0,26	0,10	0,03	0,34	0,19	0,34	0,19
0,11	0,26	0,15	0,42	0,17	0,58	0,34	0,70
0,21	0,13	0,13	0,11	0,27	0,30	0,23	0,42
0,13	0,08	0,27	0,30	0,30	0,34	0,37	0,76
0,09	0,08	0,07	0,23	0,11	0,70	0,68	0,42
0,21	0,34	0,08		0,18		0,18	
0,21	0,27	0,52		0,70		0,07	
0,13	0,23	0,08		0,08		0,23	
0,08	0,08	0,05		0,13		0,27	
0,09	0,21	0,08		0,07		0,11	
0,15		0,07		0,11		0,09	
0,13		0,08		0,08		0,13	
0,11		0,05		0,08		0,10	
0,21		0,05		0,34		0,52	
0,21		0,18		0,23		0,36	
0,21		0,12		0,15		0,19	
0,08		0,07		0,18		0,16	
0,10		0,15		0,17			
0,09		0,09		0,07			
0,13		0,11		0,07			
0,18		0,17		0,09			
0,05		0,04					
0,08		0,07					
0,11		0,04					
0,13		0,10					
0,15		0,12					
0,21		0,07					
0,21		0,09					
0,09							

Tag 36		Tag 42	
T	K	T	K
0,09	0,68	0,37	0,89
0,19	0.98	0,79	0,89
0,07	0,89	0,73	0,98
0,82	1,95	0,68	2,47
1,21	1,06	1,74	1,33
0,79		0,85	
0,33			
0,44			
0,58			
0,76			
1,28			
0,50			
0,38			
0,44			
0,63			
0,82			

Tag = Messtag

T = Therapiekollektiv

K = Kontrollkollektiv

3. ORIGINALMESSDATEN ZUM TUMOREXPERIMENT 3 (Tumor 3)
Volumenangabe in ccm

Tag 0		Tag 9		Tag 18		Tag 25	
T	K	T	K				
0,04	0,11	0,11	0,08	0,13	0,18	0,11	0,27
0,08	0,02	0,18	0,11	0,15	0,15	0,30	0,21
0,03	0,07	0,09	0,13	0,04	0,15	0,05	0,58
0,30	0,30	0,58	0,47	0,38	0,79	0,55	0,73
0,21	0,04	0,42	0,13	0,51	0,15	0,21	0,42
0,02	0,05	0,04	0,23	0,42	0,26	0,89	0,23
0,05	0,13	0,27	0,23	0,42	0,68	0,21	0,84
0,08	0,11	0,38	0,18	0,42	0,27	0,76	0,26
0,15	0,13	0,23	0,42	0,38	0,63	0,34	0,68
0,09	0,21	0,34	0,37	0,13	0,55		
0,18	0,09	0,34	0,23	0,13	0,30		
0,08		0,15		0,51			
0,08		0,23					
0,04		0,07					
0,02		0,23					
0,03		0,08					
0,07		0,26					
0,15		0,55					
0,04		0,40					
0,08		0,42					
0,11		0,51					
0,09		0,30					
0,04		0,23					
0,15		0,58					
0,15		0,58					

Tag 35	
T	K
0,38	0,47
0,70	1,54
0,42	2,05
0,95	1,01
0,68	1,77
0,68	0,63
	1,74
	0,68

Tag = Messtag

T = Therapiekollektiv

K = Kontrollkollektiv

IX. D A N K S A G U N G

Ich danke Herrn PD Dr. Dr. H. J. Staab für die Überlassung des Themas und seine stetige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente und deren Diskussion.

Herrn Prof. Dr. A. Schmid, Tiermed. Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München danke ich für die Möglichkeit der Einreichung der Arbeit und die vielen konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Herrn Dr. R. Löser, Klinge Pharma, München gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und deren Diskussion.

Herrn PD Dr. J. Kömpf, Institut für Anthropologie und Humangenetik, Tübingen, danke ich für die Durchführung der Zymogramme.

Frau Marianne Kussmaul, Klinge Pharma, München gilt mein besonderer Dank, für die Assistenz bei den Operationen an den Nacktmäusen.

Frau Angelika Kohr, Klinge Pharma, München möchte ich für die Mithilfe bei der Durchführung der Rezeptoranalysen danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. D. Stavrou, Tiermed. Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München, danke ich für die Möglichkeit in seinem Institut Gefrierschnitte am Kryostat vorzunehmen.

Herrn Dr. Th. Hännichen danke ich für die Kooperation bei der Durchführung der Gefrierschnitte.

Der Firma Klinge Pharma, München möchte ich danken für die Möglichkeit der Durchführung der vorliegenden Arbeit in ihren Labors und die jederzeit gewährte Unterstützung.

Herrn PD Dr. H.P. Fortmeyer, Tierversuchsanlage der Universität Frankfurt, danke ich für die Überlassung von zwei Spendertieren mit dem Tumor "T61".

Herrn PD Dr. H.H. Fiebig, Universität Freiburg, danke ich für die freundliche Überlassung des Tumors "XF 550" in Form von zwei Spendertieren.

Die statistischen Berechnungen sind unter Zuhilfenahme eines Programms, das von Herrn Michael Schliack, Klinge Pharma, München, entwickelt wurde, durchgeführt wurden.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter für die exakte Durchführung der Schreibarbeiten.

Lebenslauf

N a m e :	Peter, Paul, Maximilian Stelzer
Geburtstag:	17. April 1961
Geburtsort:	München
Eltern:	Helga Stelzer, geb. Eiermann - Kaufm. Angestellte Paul Stelzer, verstorben - Buchhalter
Familienstand:	ledig
Schulausbildung:	1967 - 1969 Dom-Pedro-Volksschule, München
	1970 Volksschule, Ramsau
	1971 - 1973 Max-Planck-Gymnasium, München-Pasing
	1974 - 1975 Schyren-Gymnasium, Pfaffenhofen
	1976 - 1979 Erasmus-Grasser-Gynmnasium, München
	1980 - 1981 Peter-Dörfler-Gymnasium, Marktoberdorf
	1981 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
Studium:	Wintersemester 1981/82 und Sommersemester 1982 Studium der Betriebswirtschaft an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
	Wintersemester 1982/83 Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Staatsexamen:	1988 in München
Approbation:	1988 in München